

**Analysen zur
Redundanz sowie Spezialisierung
der Connexin-Genfamilie
mittels „Knock In“-Mäusen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nicole Pielensticker

aus

Solingen

- Bonn, August 2005 -

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Klaus Willecke

2. Referent: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: 07. November 2005

Die Natur
hat jederzeit Recht,
und das gerade
am gründlichsten
wo wir sie am
wenigsten begreifen
Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung eines optimalen Arbeitsplatzes, die Möglichkeit eigenständige experimentelle Exkurse durchführen zu können und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferates und seine Hilfe in wissenschaftlichen und technischen Fragen. Herrn Prof. Dr. Koch und Frau Dr. van Echten-Deckert danke ich für die Teilnahme an der Promotionskommission.

Für die erfolgreichen Kooperationen außerhalb der Arbeitsgruppe danke ich:

Dr. J.-S. Kim (Seoul), Dr. K. Tiemann, Alexander Ghanem und Jan Schrickel (Bonn) für die Durchführung der histologischen und funktionellen kardialen Analysen

Prof. Dr. E. Winterhager (Universität Duisburg-Essen) für die ständige Diskussionsbereitschaft bei schwierigen Fragestellungen (Dank sei dem Teratom) und der tatkräftigen Unterstützung bei den histologischen Analysen beider Mauslinien.

Dr. Rüdiger Behr (Universität Duisburg-Essen) für die Durchführung der Androgenrezeptor-Analysen und

Prof. Dr. Gebhardt für die Untersuchung auf Heterogenität der Leberschnitte.

Für die Kooperation in der eigenen Arbeitsgruppe, sei es experimenteller Art oder durch Bereitstellung transgener Tiere, modifizierter embryonaler Stammzellen, Antikörper, Bakterienstämme oder Plasmide, danke ich vor allem PD Dr. Otto Traub, Christian Schlieker und Gaby Schwarz. Dr. Thomas Ott danke ich für die Betreuung in den Anfängen meiner Doktorarbeit. Für die zeitweilige Unterstützung - in der ES-Zell-Kultur sowie für die Anfertigung der Western Blot Analysen - gilt mein Dank Melanie Jokwitz und Petra Kußmann. Marco Schneider bin ich für die Herstellung der transgenen Mäuse mittels Blastozysteninjektion sehr zu Dank verpflichtet. Bei Dr. Karen Maaß und Jennifer Bohnen möchte ich mich insbesondere für die Herstellung und das Überlassen der Connexin43 „Knock In“-Mauslinie bedanken, ohne deren Hilfe ich diese zweite Mauslinie nicht hätte analysieren können.

Für das schnelle und hilfreiche Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und die Diskussionsbereitschaft möchte ich mich besonders bei Dr. Stephanie Urschel, Dr. Goran Söhl und Julia von Maltzahn bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie sowie meinen engsten Freunden, die mich durch alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitet und mich immer unterstützt haben.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gap Junctions, Connexone und Connexine	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Gap Junctions	1
1.1.2	Klassifizierung und Verbreitung der Connexin Multigenfamilie	3
1.1.3	Aufbau und Topologie der Connexine.....	4
1.1.4	Gap Junction vermittelte Kopplung.....	5
1.1.5	Regulation der Gap Junction vermittelten Kopplung.....	6
1.2	Connexin 26: Charakteristika und Erkrankungen	7
1.3	Connexin32: Charakteristika und Erkrankungen	8
1.4	Connexin43: Charakteristika.....	8
1.5	Das Maus-Modell: "Knock-In" (KI)	10
1.6	Gap Junctions in verschiedenen Zellverbänden	10
1.6.1	Gap Junctions in der Embryogenese.....	10
1.6.2	Gap Junctions in mesenchymalen Zellen und ihre Funktion im Embryo	11
1.6.3	Gap Junctions in der Leber: Cx26 und Cx32, die maßgeblichen Connexine.....	12
1.6.4	Gap Junctions im Gehirn: Kontroverse Diskussion um Cx26	14
1.6.5	Gap Junctions in den Gonaden.....	15
1.6.6	Gap Junctions in der Hypophyse	17
1.7	Ziel der Arbeit	21
2	MATERIAL	23
2.1	Allgemeine Lösungen	23
2.2	Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik.....	23
2.3	Lösungen für die Bakterienkultur.....	28
2.4	Lösungen für die Zellkultur und Blastozysten-Injektion	29
2.5	Lösungen für β -Galaktosidase- und andere Nachweise	33
2.6	Lösungen für die Protein-Analytik.....	35
2.7	Fertige Lösungen	38
2.8	Reagenziensätze (Kits)	39
2.9	Allgemeine Labormaterialien	39
2.10	Geräte.....	40
2.11	Plasmide	41
2.12	Größenstandards	43
2.13	Bakterienstämme	44
2.14	Eukaryotische Zell-Linien	44
2.15	Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer)	44
2.16	Hybridisierungssonden.....	47
2.17	Mauslinien	47
2.18	Antikörper	48
2.18.1	Primärantikörper.....	48
2.18.2	Sekundärantikörper	48
3	METHODEN	49
3.1	Nukleinsäure Analytik	49
3.1.1	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	49
3.1.2	Aufarbeitung von Nukleinsäuren	50
3.1.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	52
3.1.4	Umschreiben von RNS in komplementäre DNS (cDNS)	56

3.2	Transformation	57
3.3	Isolierung und Nachweis von Proteinen	58
3.3.1	Proteinpräparation	58
3.3.2	Protein-Analysen	58
3.4	Zellkultur	61
3.4.1	HM-1 embryonale Stammzellen (ES) der Maus	61
3.4.2	HeLa-Zellkultur	62
3.5	Tierexperimentelle Arbeiten	63
3.5.1	Allgemeines	63
3.5.2	Blastozysteninjektion (BCI)	63
3.5.3	Zyklusbestimmung weiblicher Mäuse	65
3.5.4	Zucht und Verpaarungsbedingungen der Cx26KiCx32-Mauslinie	65
3.5.5	Zucht und Verpaarungsbedingungen der Cx43Ki26-Mauslinie	65
3.5.6	Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums	66
3.5.7	Präparation von postimplantiven Mausembryonen	66
3.6	Funktionale Analysen an transgenen Tieren in toto	66
3.6.1	EKG-Messungen	66
3.6.2	Elektrophysiologische Untersuchungen (EPI) an adulten Mäusen	67
3.6.3	Statistische Auswertung	67
3.7	Analysen an transgenen Mäusen	67
3.7.1	Histologische Analysen	68
3.7.2	Expressionsanalysen	71
3.7.3	FSH-Messungen an Serum und Hypophyse	73
4	ERGEBNISSE	75
	Das Projekt: Cx26KILacZKICx32	75
4.1.1	Klonierung des Austauschvektors pCx26KILacZKICx32neo	75
4.1.2	Klonierungsstrategie	75
4.1.3	Nachweis der Funktionalität des NLS-Reportergens und des Flp/frt-, Cre/loxP-Systems	78
4.1.4	Erzeugung der Cx26 ^{26/LacZn} -Mauslinie	79
4.1.5	Erzeugung der Cx26 ^{26/LacZ} -Mauslinie	81
4.1.6	Erzeugung der Cx26 ^{26/32} -Mauslinie	88
4.2	Das Projekt: Cx43KI26	95
4.2.1	Mäuse mit gezieltem Ersatz der Cx43-kodierenden DNS durch Cx26-kodierende DNS	95
4.2.2	Heterozygot und homozygot mutierte Mäuse sind lebensfähig und exprimieren das eingebrachte Connexin ektopisch	95
4.2.3	Vitalität, Fertilität und äußeres Erscheinungsbild von Cx43 ²⁶ -Mäusen	99
5.	DISKUSSION	111
5.1	Spezialisierung oder Redundanz: „Knock In“-Mausmodelle	111
5.2	Das Projekt: Cx26KILacZKICx32	112
5.2.1	Herstellung der transgenen Mauslinie Cx26KILacZKICx32	112
5.2.2	LacZ-Reportergenausprägung an Cx26 ^{26/lacZ} -Tieren	113
5.2.3	Heterogene Cx26 Expression in der Leber war nicht eindeutig	114
5.2.4	Connexin26 wird in den Meningen exprimiert	115
5.2.5	Heterozygote Cx26 ^{26/32} -Embryonen sind nicht lebensfähig	117
5.2.6	Cx26 ^{26/32} -Embryonen: Die Entwicklung von Teratomen	119

5.2.7	Welche Erklärungsmöglichkeiten kommen für die embryonale Letalität heterozygoter Cx26 ^{26/32} -Embryonen in Betracht?	120
5.2.8	Verminderter Glukose-Transfer als Ursache der embryonalen Letalität.....	120
5.2.9	Eine Störung in der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) als Ursache für embryonale Missbildungen.....	120
5.2.10	Ausblick für die Cx26 ^{26/32} -Mauslinie.....	123
5.3	Das Projekt: Cx43KI26.....	124
5.3.1	Vitalität und äußere Erscheinung der Cx43KICx32-Mauslinie	124
5.3.2	Brustdrüsendefekt heterozygoter Cx43KI26-Weibchen	124
5.3.3	Gonadendefekte in Cx43KICx26-Mäusen	127
5.3.4	Allel-spezifische Kompensation der Connexin43-Defizienz bei der Herzmorphogenese	129
5.4	„Knock In“-Mausmodelle zur Aufklärung einer möglichen funktionellen Signifikanz	129
6.	ZUSAMMENFASSUNG	131
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	133
ANHANG	150

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

λ	Lambda (Maß: Wellenlänge)	DSP	“downstream” (Sinnstrang)-Primer
°C	Grad Celsius	DTT	1,4-Dithio-DL-threit
μ	Mikro (10^{-6})	<i>E. coli</i>	Escherichia coli (Enterobacteriaceae)
μ g	Mikrogramm	ECL	Enhanced Chemiluminescence Reaction
μ l	Mikroliter	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
32 P	Phosphorisotop 32	EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
A	Adenin oder Ampère	EKG	Elektrokardiographie
Abb.	Abbildung	ES-Zellen	embryonale Stamm-Zellen
Ac	Azetat	EtBr	Ethidiumbromid
AK	Antikörper	EtOH	Ethanol
Amp	Ampizillin	FCS	fötales Kälberserum
APS	Ammoniumpersulfat	FSH	Follikelstimulierendes Hormon
AS	Aminosäurerest	G	Guanin
ATP	Adenosintriphosphat	g	Gramm oder Erdbeschleunigung
BCI	Blastozysteninjektion	h	Stunde
bp	Basenpaare	hCG	humanes Chorion Gonadotropin
BrdU	5-bromo-2'-desoxy-Uridin	HCl	Salzsäure
BSA	Rinderserumalbumin	HE	Hämatoxilin-Eosin
C	Cytosin	HO	homozygot
C	Konzentration	HR	homologe Region
Ca ²⁺	Calciumkation	HT	heterozygot
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	i.p.	intraperitoneal
cDNS	DNS-Kopie einer RNS	IB	Immunoblot
cGMP	zyklisches Guanidinmonophosphat	IF	Immunfluoreszenz
CMTX	X-chromosomal vererbte Charcot-Marie Tooth Krankheit	Ig	Immunoglobulin
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute	IGF	Insulin-like Growth Factor
CR	Kodierende Region	IP	Immunpräzipitation
Cx	Connexin	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
D	Dalton	Kana	Kanamyzin
DAB	Diaminobenzidin	kb	Kilobasen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	kDa	Kilodalton
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser	kg	Kilogramm
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	KI	Knock In
deion.	deionisiert	KO	Knock Out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	l	Liter
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	LB	Luria-Bertani-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid	LH	luteinisierendes Hormon
DNase	Nuklease	LIF	Leukämie Inhibierungs-Faktor
DNS	Desoxyribonukleinsäure	Lsg.	Lösung
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	M	Molar (mol/l)
dpc	<i>dies post coitum</i> , Tage nach der Empfängnis	m	Milli (10^{-3})
dsDNS	doppelsträngige DNS	mA	Milliampère

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mAb	monoklonaler Antikörper	SA	Spleißakzeptorstelle
mCi	Millicurie	SBL	Southern Blot
MCS	Multiple Klonierungsstelle	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
MEM	Modified Eagle Medium	sec.	Sekunde
mg	Milligramm	SSC	Natriumchlorid-/Trinatriumcitratlösung
min.	Minute	ssDNS	einzelsträngige DNS
ml	Milliliter	TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung
mM	Millimolar	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
mRNS	Boten-RNS	Tet	Tetrazyklin
mV	Millivolt	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
MW	Molekulargewicht	Tris-HCl	Tris mit Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert titriert
n	Nano (10^{-9})	U	Enzymeinheit (Unit)
nA	Nanoampère	ün	über Nacht
NaAc	Natriumacetat	Upm	Umdrehungen pro Minute
NaCl	Natriumchlorid	ÜS	Überstand
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid	USP	„upstream“ (Gegenstrang)-Primer
NaOH	Natronlauge (Natriumhydroxid)	UV	Ultraviolettes Licht
NCS	Neugeborenen-Kälberserum	V	Volt
ng	Nanogramm	v/v	Volumen pro Volumen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal	vol	Volumen
nm	Nanometer	W	Watt
OD	Optische Dichte	w/v	Masse pro Volumen
ODDD	Oculodentodigitale Dysplasie	X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
ORF	offenes Leseraster		
p	piko (10^{-12})		
PAA	Polyakrylamid		
pAb	polyklonale Antikörper		
PAGE	Polyakrylamid Gelelektrophorese		
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung		
pBSK	Klonierungsplasmid Blueskript		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin		
PFA	Paraformaldehyd		
pfu	<i>plaques forming unit</i>		
pg	Pikogramm		
PGK	Phosphoglyzeratkinase		
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration		
PKA	Proteinase A		
PKC	Proteinase C		
pmol	Pikomol		
PO	Peroxidase		
RNS	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		

-
- 1.1 Schematische Darstellung von Gap Junction Kanälen
 - 1.2 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Connexin Proteins
 - 1.3 Mögliche Zusammensetzung von Gap Junction Kanälen
 - 1.4 Schematischer und histologischer Aufbau der Leber
 - 1.5 Abbildung des Gehirns der Maus
 - 1.6 Reifungsstadien humaner Follikel im adulten Ovar
 - 1.7 Schematische Darstellung der Entwicklung und Lage der Hypophyse
-

- 4.1.1 Vektorkarte des Austauschvektors
 - 4.1.2 Funktionalität des LacZ-Reportergens in HeLa-Zellkultur
 - 4.1.3 Schema zur Anwendung der Flp- und Cre-Rekombinase
 - 4.1.4 Rekombinationsschema und Southern blot Analyse
 - 4.1.5 PCR-, Southern blot Analyse und Flp-/Cre-Schemadarstellung
 - 4.1.6 RT-PCR
 - 4.1.7 Western blot Analyse
 - 4.1.8 β -Galaktosidase-Nachweis an Embryonen
 - 4.1.9 β -Galaktosidase-Nachweis an Organen
 - 4.1.10 Immunfluoreszenzanalysen an Leber und Gehirn
 - 4.1.11 Vergleich der Cx26^{26/32}-Phänotypen
 - 4.1.12 Makroskopische Analysen an Cx26^{26/32}-Embryonen
 - 4.1.13 Histologische Analysen an Cx26^{26/32}-Embryonen (Überblick)
 - 4.1.14 Histologische Analysen an Gehirn und Wirbelsäule
-

- 4.2.1 Rekombinationsschema, PCR- und Southern blot Analyse
 - 4.2.2 RT-PCR Analysen
 - 4.2.3 Western blot Analysen
 - 4.2.4 Mendelsche Verhältnis, Kaplan-Maier-Kurve und Gewichtsbestimmung
 - 4.2.5 Vier-Kammer-Histologie adulter Herzen
 - 4.2.6 Histologische Analysen der Brustdrüsen laktierender Cx43²⁶-Weibchen
 - 4.2.7 Gonadengewichte in Relation zum Körpergewicht
 - 4.2.8 Histologie der Cx43²⁶-Ovarien
 - 4.2.9 Histologische Analysen des Uterus
 - 4.2.10 Übersicht über Hoden (gesamt)
 - 4.2.11 Histologie der Hoden und Nebenhoden
 - 4.2.12 FSH-Messungen in Serum und Hypophyse
-

1 EINLEITUNG

Interzelluläre Kommunikation über Gap Junction Kanäle ist eine Möglichkeit für eine gleichmäßige Verteilung von Ionen und Metaboliten, eine schnelle Informationsausbreitung und ein koordiniertes Zusammenwirken von Zellen zur Ausbildung eines funktionellen Zellverbandes. Die Fähigkeit benachbarte Zellgrenzen zu verbinden, die durch einen 20-30 nm Spalt voneinander getrennt sind, gab den Gap Junctions ihren Namen (*engl.* gap = Spalt; junction = Kontaktstelle).

Gap Junctions wurden in den Plasmamembranen benachbarter Zellen von REVEL und KARNOVSKY (1967) entdeckt. In Säugetieren werden Gap Junction Verbindungen aus Connexin Proteinen aufgebaut. Im Tierreich sind ähnliche Zell-Zell-Verbindungen ab der Stufe der Coelenterata bekannt (FRASER et al., 1987). In Invertebraten werden topologisch und funktional ähnlichen Strukturen von Innexin Proteinen ausgebildet (PHELAN und STARICH, 2001), welche den Pannexinen der Vertebraten zu entsprechen scheinen (BRUZZONE et al., 2003). Im Folgenden werden Gap Junctions, die Kanäle aus Säugetieren, beschrieben.

1.1 Gap Junctions, Connexone und Connexine

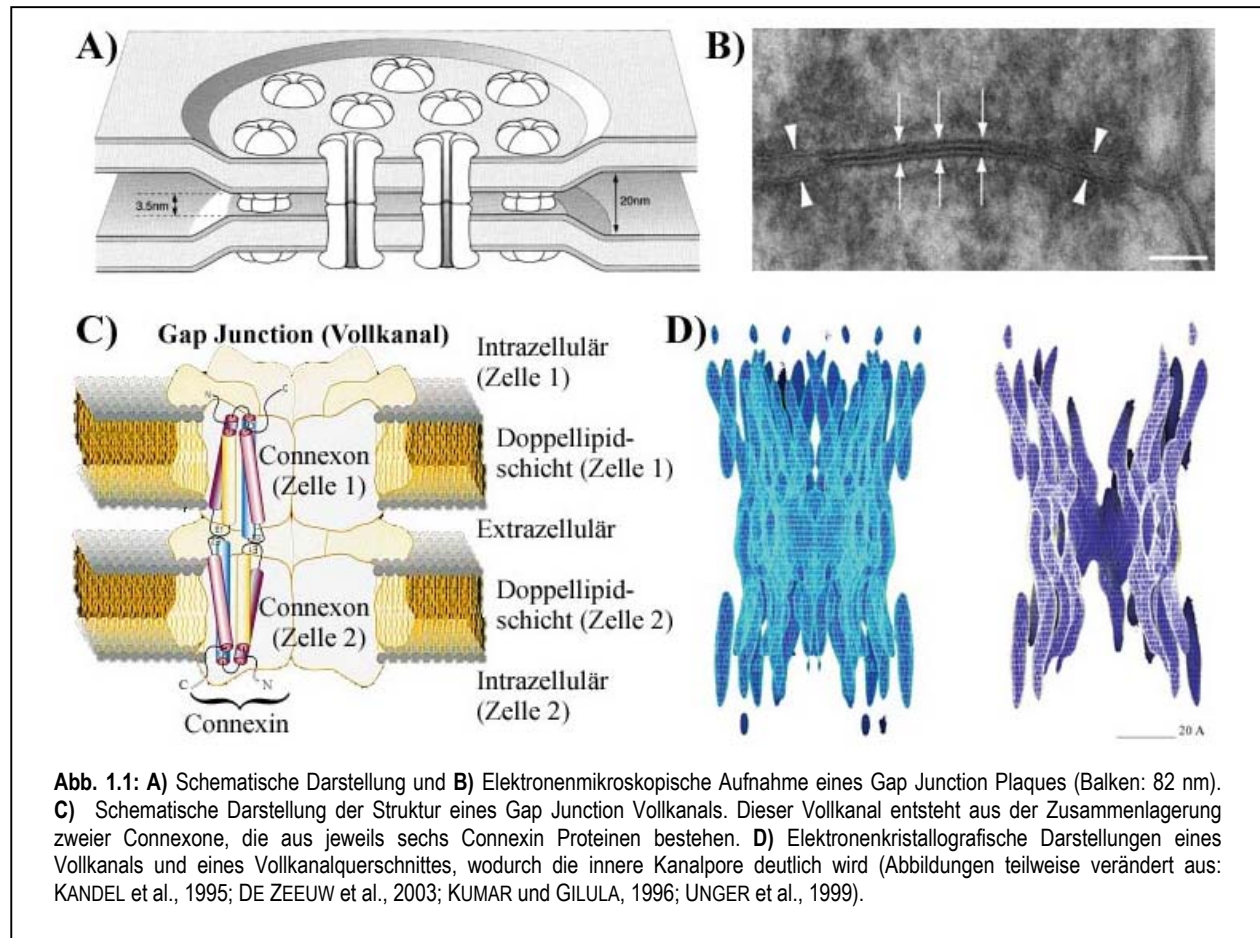
1.1.1 Aufbau und Funktion der Gap Junctions

Gap Junctions zeichnen sich durch eine Annäherung benachbarter Zellmembranen auf 2-5 nm aus (REVEL und KARNOVSKY, 1967; siehe Abb. 1.1). Nahezu alle Säugetierzellen weisen im Laufe ihrer Entwicklung Gap Junction Kanäle auf (LO, 1996), mit Ausnahme ausdifferenzierter Zellen bzw. Zellverbände, wie die Myozyten der Skelettmuskulatur, Spermien, Erythro- und Thrombozyten (GILULA et al., 1987).

Die Ansammlung mehrerer Gap Junction Kanäle in einer Lipiddoppelschicht wird als Plaque bezeichnet (Abb. 1.1). Die Erkennung und das Andocken der Halbkanäle führt zu einer ausreichenden Abdichtung gegenüber dem Extrazellularraum und zur Ausbildung eines funktionalen interzellulären Kanals (DAHL et al, 1992).

Ein Gap Junction Kanal setzt sich aus zwei Halbkanälen (Connexonen) zusammen (Abb. 1.1). Jeder Halbkanal wiederum ist aus sechs Untereinheiten, den Connexinen, aufgebaut, die in Form einer hexameren Rosette in der Plasmamembran nachzuweisen sind (siehe 1.1; YEAGER et al., 1992; CASICO et al., 1995). Nach der intrazellulären Zusammenlagerung der Connexin Proteine zu einem Connexon im *trans*-Golgi-Netzwerk (MUSIL und GOODENOUGH, 1993; EVANS und MARTIN, 2002) und dem Transport in die Plasmamembran kommt es zu einer engen Aneinanderlagerung zweier Halbkanäle innerhalb des interzellulären Spalts. Die beiden extrazellulären Schleifen der Connexin Proteine stellen die Kontaktbereiche der Connexone dar (KUMAR und GILULA, 1996). Die konservierten Cysteine der Extrazellular-

schleifen scheinen dabei (Abb. 1.2) für die Bildung funktioneller Kanäle essentiell zu sein. Darüber hinaus wird vermutet, dass Proteinmodifikationen (insbesondere Phosphorylierung) der zytoplasmatischen Bereiche der beteiligten Connexine, an der Ausbildung bzw. Modulation der Kanaleigenschaften beteiligt sein könnten (LAMPE und LAU, 2004).



Die Connexone haben einen Außendurchmesser von 7-8 nm und einen Abstand zueinander von ungefähr 9 nm, wohingegen der hydrophile Kanal einen Innendurchmesser von ungefähr 2 nm aufweist (siehe Abb. 1.1; UNGER et al., 1999). Gap Junction Kanäle stellen eine direkte Verbindung der Zytoplasmata zweier benachbarter Zellen her und gewährleisten den passiven, auf Diffusion beruhenden Durchtritt polarer oder ungeladener Moleküle (cAMP, IP₃, Ca²⁺ etc) bis zu einer Molmasse von 1000 Da und einem Durchmesser von 1,5 nm (PITTS et al., 1977; SIMPSON et al., 1977). Neben homomeren Connexonen, bestehend aus sechs identischen Connexinen, können sich auch heteromere Halbkanäle, die sich aus unterschiedlichen Connexinen zusammensetzen, in Erscheinung treten. Die Assoziation der jeweiligen

Halbkanäle wiederum, schafft das Potential der Ausbildung eines homotypischen oder heterotypischen Gap Junction Kanals, welche durch ein hohes Ausmaß an Vielfalt, bezüglich der beteiligten Connexine, gekennzeichnet sein können (KUMAR und GILULA, 1996; DELMAR, 2002). Je nach Zusammensetzung der beteiligten Connexine können derartige heterotypische Mischkanäle einen asymmetrischen Stoffaustausch gewährleisten und als eine Art Gleichrichter fungieren (ROBINSON et al., 1993; BRINK et al., 1997). Eine zusätzliche Bereicherung dieser Vielfalt stellt die Entdeckung funktionaler Halbkanäle *in vivo* dar, die losgelöst von ihrer Rolle als interzelluläre Kanal-Komponenten autonom existieren können und wahrscheinlich aufgrund der potentiellen Verbindung zum Extrazellularraum einer differenzierten Regulation unterliegen, die den Öffnungszustand steuert (LI et al., 1996; TREXLER et al., 1999). Jedoch können nicht alle homomeren Halbkanäle funktionelle, heterotypische Gap Junction Kanäle bilden (ELFGANG et al., 1995). Auf diese Weise kann eine Kopplung oder auch Abgrenzung von Zellverbänden über Gap Junction Kanäle gegenüber anderen Kompartimenten erfolgen. Komplexe Regulationsmechanismen der interzellulären Kommunikation werden durch die unterschiedliche Zusammensetzung von Connexonen ermöglicht (WHITE und BRUZZONE, 1996; WILLECKE und HAUBRICH, 1996), ebenso wie ein funktioneller Stoffaustausch mit dem Extrazellularraum (GOODENOUGH und PAUL, 2003; SÁEZ et al., 2003).

1.1.2 Klassifizierung und Verbreitung der Connexin Multigenfamilie

Bisher konnten insgesamt 20 Connexine im Genom der Maus und 21 Connexine im Genom des Menschen auf jeweils unterschiedlichen Chromosomen, aber z. T. in Genclustern angeordnet, identifiziert und teilweise charakterisiert werden (WILLECKE et al., 2002; SÖHL und WILLECKE, 2003).

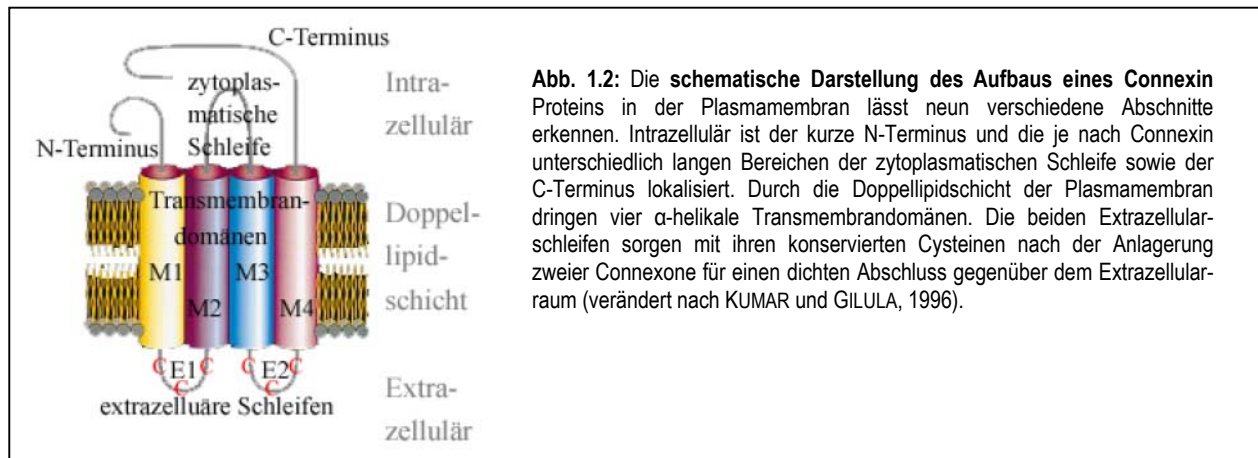
Zur Einteilung der Connexine existieren zwei Nomenklaturen, die unterschiedliche Kriterien berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wird das System nach BEYER et al., 1987 benutzt, dass die Connexine gemäß ihres Ursprungsorganismus sowie der Molmasse einteilt. In folgendem Beispiel: „mCx26“ verweist der Kleinbuchstabe „m“ auf den Herkunftsorganismus: „mouse“ („h“: „human“); Connexin wird durch die Buchstaben „Cx“ abgekürzt und die Zahl „26“ spiegelt die Molmasse in Kilodalton (kDa) wieder.

Bis auf einige Ausnahmen weisen die Connexine (Cx26, Cx32 und Cx43) untereinander einen vergleichbaren genomischen Aufbau auf (WILLECKE et al., 2002). Zwei Exons (Exon I und Exon II) werden durch unterschiedlich lange Intronsequenzen voneinander getrennt. Die kodierende Region und das PolyA-Signal befinden sich, frei von Intronsequenzen, ausschließlich auf dem Exon II. Neueren Analysen zufolge gibt es Connexine, die von diesem Schema abweichen, z.B. mCx36 (SÖHL et al., 1998). Cx30 und Cx32 weisen alternative Promotoren auf, so dass das Exon I alternativ gespleißt werden kann (NEUHAUS et al., 1995; SÖHL et al., 2001).

1.1.3 Aufbau und Topologie der Connexine

Der konservierte genomische Aufbau der einzelnen Mitglieder der Connexin Multigenfamilie gab Anlass zur Vermutung einer ähnlichen Konservierung der Connexin Proteinstrukturen (KUMAR und GILULA, 1992; PAUL et al., 1993; BEYER et al., 1994). Hydrophobizitätsanalysen führten zur Entwicklung eines Strukturmodells, nach dem jedes Connexin vier α -helikale Transmembrandomänen (M1-4), zwei extrazelluläre (E1 und E2) und drei zytoplasmatische Regionen aufweist (Abb. 1.2). Der N- und C-Terminus der Connexin Proteine befindet sich im Zytoplasma der Zelle.

Die Spannungsabhängigkeit der Gap Junction Kanäle wird vermutlich durch den N-Terminus reguliert, der bei allen Connexin Proteinen eine Länge von etwa 20 Aminosäuren aufweist (HARRIS, 2002). Die α -helikalen Transmembrandomänen sind hoch konserviert und besitzen einen überwiegend hydrophoben Charakter. Die dritte Transmembrandomäne weist jedoch durch die Anwesenheit von polaren Aminosäuren einen deutlich amphiphileren Charakter auf. Man postulierte, dass diese Domäne den inneren Bereich der hydrophilen Kanalpore auskleidet und dadurch die unterschiedlichen Permeabilitätseigenschaften der Gap Junction Kanäle beeinflusst (ELFGANG et al., 1995). Es scheinen jedoch ebenfalls Abschnitte der anderen Transmembranregionen daran beteiligt zu sein (SKERRETT et al., 2002). Die extrazellulären Schleifen sind hoch konserviert und ungefähr 25 Aminosäuren lang. Charakteristisch für die beiden Extrazellulärschleifen sind meist drei konservierte Cysteine (KUMAR und GILULA, 1992).



Die zytoplasmatische Schleife sowie der C-Terminus weisen die größte Variabilität der einzelnen Connexine untereinander auf und sind somit charakteristisch für das jeweilige Connexin. Wie im Abschnitt 1.1.6 beschrieben, werden dem C-Terminus verschiedene Funktionen bei Zusammensetzung und Regula-

tion des Öffnungszustands der Gap Junction Kanäle (YEAGER und NICHOLSON, 1996) sowie bei der Interaktion mit spezifischen, zellulären Proteinen wie ZO-1 (GIEPMANS und MOOLENAAR, 1998) zugeschrieben.

Analog zu anderen bekannten Plasmamembranproteinen scheint der Transport der Connexine zur Plasmamembran - mit einigen Ausnahmen- durch den sekretorischen intrazellulären Transportweg zu verlaufen (PFEFFER et al., 1987). Im Vergleich zu anderen multimeren Membranproteinen scheinen die Connexine nicht im ER (endoplasmatisches Retikulum), sondern erst nach Verlassen des ER's, im *trans*-Golgi in wechselseitiger Assoziation vorzuliegen (FALK et al., 1997). Sie gelangen in Form von Halbkanälen an die Zellmembran und werden an der Außenseite bereits bestehender Gap Junction Plaques integriert (GAETTA et al., 2002).

Der Abbau von Gap Junction Kanälen aus der Membran erfolgt über die Bildung annulärer Gap Junctions (JORDAN et al., 2001) oder durch Ubiquitin-abhängige proteasomale bzw. lysosomale Degradation, die Halbwertszeit von Connexinen variiert zwischen 1 und 5 Stunden (SÁEZ et al., 2003).

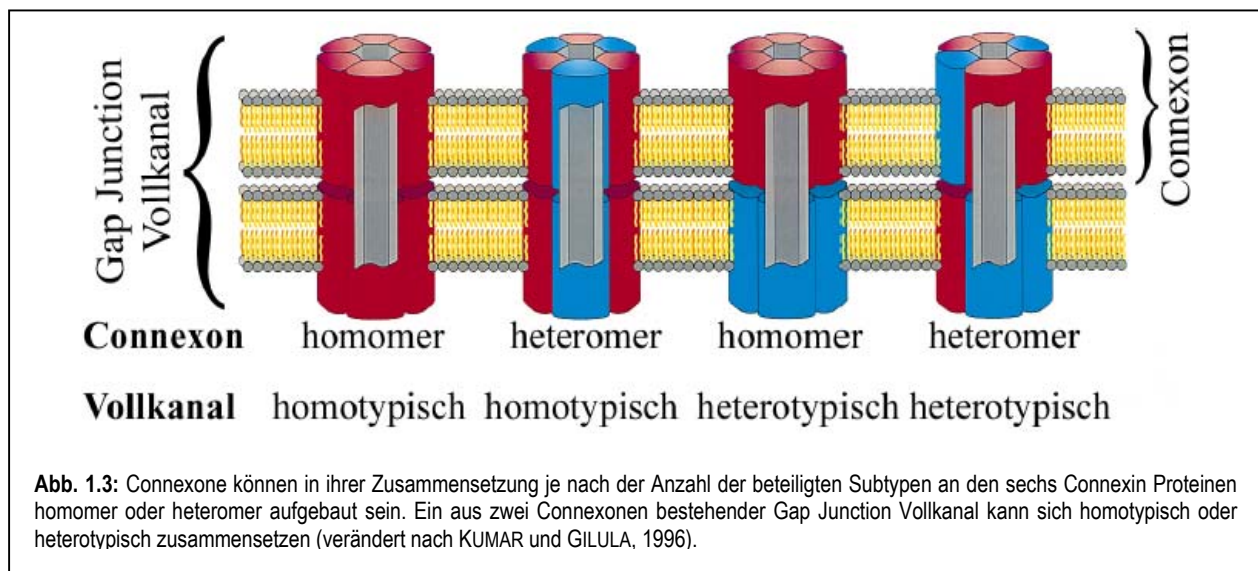
Die genauen Mechanismen, die zur Beeinflussung des Connexon Transports und der Verankerung in der Ziellmembran durch Proteine des Zytoskeletts, wie z.B. dem Calcium-abhängigen E-Cadherin zuständig sind, sind weitgehend unbekannt. Eine direkte Interaktion zwischen dem C-Terminus von Cx43 und den Skelettproteinen ZO-1 bzw. dem α - und β -Tubulin wurde durch TOYOFUKU et al., 1998 bzw. durch GIEPMANS et al., 1998, 2001 beschrieben. Darüber hinaus wurden Interaktionen von Cx43 mit Calveolin1 (SCHUBERT et al., 2003), β -Catenin (WU et al., 2003), N-Cadherin und p120 (XU et al., 2001) beschrieben. Man nimmt an, dass nach dem Erreichen der Ziellmembran die Halbkanäle beider Zellmembranen über die extrazellulären Schleifen ihrer Connexin Untereinheiten eine Interaktion eingehen können (LI et al., 1996). Dabei scheinen die konservierten Aminosäuren an der richtigen Connexin Konformation maßgeblich beteiligt zu sein, indem sie intramolekular, aber keine intermolekularen Disulfidbrücken der extrazellulären Schleifen gewährleisten (RAHMAN und EVANS, 1991; FOOTE et al., 1998).

1.1.4 Gap Junction vermittelte Kopplung

Gap Junctions sind an metabolischen, signal-vermittelnden, sowie elektrischen Kopplungen zwischen Zellen eines Zellverbandes beteiligt. Die Erregungsausbreitung im Herzen sowie im zentralen Nervensystem (ZNS), die Kontrolle des Zellwachstums (YAMASAKI et al., 1999) und der Karzinogenese (KRUTOVSKIKH et al., 2002; SCHWARZ et al., 2003), die Regulation früher Entwicklungsprozesse und der Stoffaustausch in nicht vaskularisierten Geweben (PAUL, 1995) zählen hierzu.

Zucker, Aminosäuren, Vitamine und Nukleinsäurevorstufen diffundieren im Rahmen der metabolischen Kopplung über Gap Junctions (SÖHL und WILLECKE, 2003) und dienen der Versorgung von Zellen, die ent-

fernt von Blutgefäßen liegen. Physiologisch bedeutsam ist z.B. die Tatsache, dass spezielle Botenstoffe diffundieren können, wie z.B. cAMP, cGMP, Ca^{2+} -Ionen, IP_3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) (GOLDBERG et al., 1998; SÁEZ et al., 1989, 2003; NIESSEN et al., 2000), sowie ADP/ATP und NAD^+ (Nikotinamadenindinukleotid) (BRUZZONE et al., 2001; EBIHARA et al., 2003; GOODENOUGH und PAUL, 2003), Calciumionen (SÁEZ et al., 1989) und Protonen (H^+ , ZANIBONI et al., 2003), die für die Signaltransduktion und Aufrechterhaltung der Homöostase bedeutsam sind. Unabhängig davon kann eine elektrische Kopplung durch die Ausbildung von Gap Junctions („elektrische Synapsen“) realisiert werden, die vor allem in neuronalen Geweben zur schnellen Reizweiterleitung vorherrschend sind, sowie zur Synchronisation intrinsischer Oszillationen beitragen (Übersicht in VAN VEEN et al., 2001; ZOIDL und DERMETZEL, 2002; CONNORS et al., 2004; DE ZEEUW et al., 2003; SÖHL et al., 2005).



1.1.5 Regulation der Gap Junction vermittelten Kopplung

Die ersten beschriebenen chemischen Inhibitoren der Gap Junction vermittelten Kopplung stellten der pH-Wert (TURIN und WARNER, 1977) und Ca^{2+} -Ionen (ROSE und LOEWENSTEIN, 1976) dar. Die Abhängigkeit vom pH-Wert und die ihr zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden u. a. in einer Reihe von elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus*-Oozyten, die unterschiedliche Connexine zur Expression brachten, erforscht (LIU et al., 1993; EK et al., 1994; WHITE et al., 1994). Experimente mit verkürzten oder durch zielgerichtete Mutagenese veränderten Connexinen ergaben, dass die Länge und Primärsequenz der zytoplasmatischen Schleife als auch des C-Terminus eine entscheidende Rolle bei der chemischen Beeinflussung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit („gating“) besitzen (VERSELIS et al., 1994).

Zwei Mechanismen werden für die Regulation des Öffnungszustands von Gap Junction Kanälen diskutiert. Im „Irisblenden“-Modell wird der Verschluss des Vollkanals durch eine Rotation bzw. Konformationsänderung der Connexine innerhalb der Connexone herbeigeführt (UNWIN und ENNIS, 1983; PERKINS et al., 1998). Das so genannte „Ball an der Kette“-Modell wird als Erklärungsgrundlage für die pH-, Calcium- und spannungsabhängige Regulation von Gap Junction Kanälen herangezogen und orientiert sich am Prinzip der Inaktivierung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle. Es wird postuliert, dass durch die Verlagerung des äußersten Bereich des zytoplasmatischen C-Terminus („Ball“), der verbunden über einen flexiblen Verbindungsbereich („Kette“, Hauptbereich des C-Terminus), die hydrophile Pore verschlossen werden kann (MORLEY et al., 1996; HOMMA et al., 1998; STERGIOPOULOS et al., 1999; DUFFY et al., 2002; DELMAR et al., 2004).

Einer anderen Hypothese zufolge kann die Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit auf der Aktivierung einer Proteinkinase und einer sukzessiven Phosphorylierung der Connexine beruhen. Die post-translational Connexin Phosphorylierung findet hauptsächlich an Serin- und Threoninresten statt und scheint im Fall von Cx43 an dem zielgerichteten Transport zur Plasmamembran beteiligt zu sein (MÉGE et al., 1988). Neben der weiteren Regulation der Connexon-Connexon Interaktion scheint die Phosphorylierung auch einen Einfluss auf die biophysikalischen Kanaleigenschaften zu besitzen. In funktionellen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung einer Proteinkinase die Kanalphosphorylierung in einer Kinase- und Connexin-abhängigen Weise zur Folge hatte (MORENO et al., 1994; KWAK et al., 1995; BAO et al., 2004). Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung könnte einen schnellen, dynamischen Umschaltmechanismus darstellen, der eine erschwerte oder erleichterte interzelluläre Weiterleitung spezifischer Signale gewährleistet (LAMPE et al., 2000; GOODENOUGH und PAUL, 2003). Zahlreichen Untersuchungen zufolge üben viele Reagenzien, Wachstumsfaktoren oder virale Onkogene ebenfalls einen Einfluss auf die Gap Junction vermittelte Kopplung aus und gehen in den meisten Fällen mit einer Veränderung des Phosphorylierungsgrades einher (HOTZ-WAGENBLATT et al., 1993). Die Leitfähigkeit interzellulärer Kanäle wird auch durch eine Vielzahl lipophiler Substanzen reguliert.

1.2 Connexin 26: Charakteristika und Erkrankungen

GABRIEL et al, 1998 zeigte, dass Cx26^{-/-}-Embryonen in der Maus zwischen Tag 10 pc und 11 pc der Embryonalentwicklung an einem Defekt des Nährstofftransfers über die Plazentaschranke sterben. Der Nährstofftransport erfolgt bei Mäusen über einen mehrlagigen Synzytiotrophoblasten, dessen einzelne Zell-Lagen durch Cx26 Gap Junction Kanäle verbunden sind. Durch Experimente mit einem radioaktiv markierten Glukoseanalogon konnte gezeigt werden, dass eine starke Einschränkung des Transports über

diese Zellschicht in Cx26-defizienten Embryonen vorlag. Durch die embryonale Letalität der Tiere konnten Phänotypen, die beim adulten Menschen beobachtet wurden, nicht bestätigt werden. Mutationen im humanen Cx26 Gen sind die Ursache für nicht-syndromische, sensorineurale Schwerhörigkeit (KELSELL et al., 1997) und für Hautkrankheiten (KELSELL et al., 2000) beim Menschen. Die palmoplantare Keratose (VERBOV, 1987) und hidrotische ektodermale Dysplasie (KIBAR et al., 1996) sind autosomal dominante Hauterkrankungen, hervorgerufen durch Mutationen im Cx26 Gen. Mit Hilfe der gezielten Ausschaltung des Cx26 Gens im Innenohr konnte bei Mäusen in Analogie zum Menschen ein Hördefekt gezeigt werden (COHEN-SALMON et al., 2002).

In der Maus wurde eine Cx26 Expression außer in der Plazenta (GABRIEL et al., 1998) in folgenden Organen beschrieben: Leber (ROSENBERG et al., 1992; IWAI et al., 2000), Niere (HENNEMANN et al., 1992), Haut (RISEK et al., 1992, 1994; SALOMON et al., 1994), Cochlea (KIKUCHI et al., 1995, 2000; FRENZ und VAN DE WATER, 2000), Dünndarm, und Schilddrüse (MEDA et al., 1993).

1.3 Connexin32: Charakteristika und Erkrankungen

Cx32^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und fertil. Sie zeichnen sich jedoch durch eine verringerte Glukose-Mobilisierung in der Leber bei artifizieller Stimulation sympathischer Nerven aus. Anders als beim Menschen ist bei der Maus nur der periportale Bereich der Leberläppchen innerviert. Von dort werden die Signale anscheinend über Gap Junction vermittelte Kopplung an die weiter in Richtung der Zentralvene des Leberläppchens liegenden Hepatozyten weitergeleitet (NELLES et al., 1996). In fortgeschrittenem Alter zeigen Cx32-defiziente Mäuse in Analogie zu Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMTX)-Patienten eine Degeneration des peripheren Myelins und eine damit einhergehende Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit (ANZINI et al., 1997). Aufgrund der kürzeren Übergangsstrecke bei Mäusen ist die motorische Beeinträchtigung der Tiere jedoch gering. Zudem konnte mit einer gegenüber Kontroll-Tieren stark gesteigerten Inzidenz für chemisch induzierte Lebertumore an Cx32^{-/-}-defizienten Mäusen erstmals ein direkter Beweis für die Rolle eines Connexins in der Wachstumskontrolle *in vivo* erbracht werden (TEMME et al., 1997).

1.4 Connexin43: Charakteristika

REAUME et al., 1995 zeigte, dass Cx43^{-/-}-Mäuse postnatal letal sind. In der Embryonalentwicklung kommt es ab Tag 10 pc zu einer verzögerten Drehung der Herzscheife und zur Bildung von intertrabekulären Taschen im Bereich zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonararterie. Die postnatale Trennung vom mütterlichen Kreislauf führt zur tödlichen Zyanose (YA et al., 1998; REAUME et al., 1995). Die Cx43^{-/-}-Maus zeigt nur in wenigen Punkten Übereinstimmung mit menschlichen Krankheiten (PAZNEKAS et al., 2003). So wurde

beim Menschen beschrieben, dass Punktmutationen im Cx43 Gen mit Herzmissbildungen in Verbindung gebracht werden (BRIZ-CUNNINGHAM et al., 1995). Die Erkrankungen Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD) (PAZNEKAS et al., 2003) und das hypoplastische linke Herzsyndrom (HLHS) (DASGUPTA et al., 2001) wurden ebenfalls im Zusammenhang mit Mutationen im Cx43 Gen beschrieben.

Das Cx43 Protein wurde erstmals bei der Isolierung von Gap Junction Plaques aus dem Herzen entdeckt (MANJUNATH et al., 1984). Im murinen, adulten Herz wird Cx43 Protein insbesondere im Arbeitsmyokard exprimiert (Übersicht in: SEVERS et al., 2004). Des Weiteren wird Cx43 Protein in endothelialen Zellen (HAEFLIGER et al., 2004; THEIS et al., 2004) sowie in der glatten Muskulatur der Gefäße (HAEFLIGER et al., 2004), des Darms (WANG und DANIEL, 2001) und des Uterus (MITCHELL und LYE, 2001) gefunden. Astrozyten des ZNS (THEIS et al., 2003), Epithelzellen der Augenlinse und Cornea (WHITE et al., 2001; LAUX-FENTON et al., 2003), Keratinozyten des *Stratum basale* und *spinosum* (KRETZ et al., 2003) sowie myoepitheliale Zellen der Milchdrüsen (PLUM et al., 2000) enthalten ebenfalls Cx43 Protein. Keimdrüsen exprimieren Cx43 Protein sowohl in den Leydig- und Sertoli-Zellen des Hodens (ROSCOE et al., 2001) wie auch in den Granulosazellen reifender Follikel des Ovars (GITTENS et al., 2003). Zudem wurde die Expression von Cx43 Protein in hämatopoetischen Zellen des Rückenmarks (OVIEDO-ORTA und HOWARD, 2004) sowie in Thymus (ALVES et al., 1995) und Milz nachgewiesen (KRENACS et al., 1996). Auch in den Odontoblasten sich entwickelnder Zähne (MURAKAMI et al., 2001) und in Osteoblasten (CASTRO et al., 2003) wurde die Expression von Cx43 Protein belegt.

Im Fall von Cx43 wurde schon mehrfach die kodierende Region gegen ein anderes Mitglied der Connexin Familie ausgetauscht. In PLUM et al., 2000 wurden die beiden Mauslinien Cx43KI32 („KI“ = „Knock-In“) und Cx43KI40 beschrieben. Beide Knock-In Linien sind lebensfähig, d.h. die eingebrachten Connexine können Cx43 fast vollständig ersetzen. Bei beiden Linien konnte jedoch eine stark reduzierte Fertilität beobachtet werden. Im Fall der Cx43KI32-Mäuse wurden schwach ausgeprägte Auffälligkeiten am Herzventrikel beobachtet und bei heterozygoten Weibchen ein Brustdrüsen-Defekt, der teilweise zum Verlust kompletter Würfe führte. In einer weiteren Knock-In Linie wurde die gesamte carboxyterminale Domäne (Δ CT) des Cx43 Proteins deletiert (MAAß et al., 2004). Ein unmittelbar postnatal letaler Effekt konnte nicht beobachtet werden. Allerdings stirbt eine Vielzahl der homozygoten Tiere stirbt in der ersten Lebenswoche und fällt durch ihr Wachstumsdefizit sowie ihre phänotypischen Merkmale der Haut im Vergleich zu ihren Geschwistern auf.

1.5 Das Maus-Modell: “Knock-In” (KI)

Die Herstellung von Mäusen mit gezielt mutierten Genen gehört heute zur molekularbiologischen Routine. Bei der konventionellen Methode zur Ausschaltung von Genen wird die kodierende Region des Zielgens im Genom durch eine Selektionskassette und gegebenenfalls ein Reportergen ersetzt (NAGY et al., 2003). Die resultierenden transgenen Mäuse werden im homozygoten Zustand als „Knock out“-Mäuse (KO) bezeichnet (NAGY et al., 2003). Mit Hilfe dieser KO-Mäuse konnten die Funktionen der jeweiligen, ausgeschalteten Gene *in vivo* untersucht werden und teilweise Zusammenhänge zu menschlichen Erbkrankheiten hergestellt werden. Mit dem System der konditionalen Ausschaltung von Gensequenzen durch die Systeme Cre/loxP und Flp/frt (KÜHN und SCHWENK, 1997; LEWANDOSKI, 2001) können Zelltyp- und/oder Entwicklungsspezifische Deletionen durch ortsspezifische Rekombinasen durchgeführt werden. Eine embryonale oder postnatale Letalität kann hierdurch umgangen werden.

Im Fall von „Knock In“-Mäusen kann die kodierende Region eines Gens gegen ein anderes Mitglied einer Multigenfamilie ausgetauscht werden. Dies ermöglicht eine Analyse der funktionellen Spezialisierung und Redundanz der einzelnen Mitglieder einer Multigenfamilie *in vivo*. Zudem gestattet dieses Maus-Modell das Einfügen subtiler Punktmutationen zur Erzeugung menschlicher Erbkrankheiten in einem Gen Locus (MOORE et al., 1995) oder die Mutation regulatorischer Elemente (HORMUZDI et al., 1998).

1.6 Gap Junctions in verschiedenen Zellverbänden

1.6.1 Gap Junctions in der Embryogenese

In Vertebraten wurden Gap Junctions in frühen Stadien der Embryogenese beschrieben, so konnten beispielsweise in der Maus ab dem 8-Zell-Stadium Gap Junction Kanäle nachgewiesen werden (VALDIMARSSON und KIDDER, 1995). Im Verlauf der Entwicklungsprozesse werden Gap Junctions auf bestimmte Zellgruppen begrenzt und ermöglichen eine Unterteilung des gesamten Embryos in Kopplungskompartimente (LEVIN, 2002), innerhalb deren Grenzen eine Kommunikation stattfinden kann. Unklar bleibt die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Connexin Proteine, die während der frühen embryonalen Entwicklung, exprimiert und als Gap Junctions in die Plasmamembran eingebaut werden. In den meisten der vorhandenen KO-Mauslinien konnte keine spezifische Rolle der Connexine in der frühen Embryonalentwicklung gezeigt werden. Obwohl einige Hinweise dafür sprechen, dass Gap Junctions in diesem frühen Stadium überflüssig sind, ist es schwierig dies für den Prozess der Einnistung und der Erhaltung der Homöostase zwischen den differenzierten Trophodermzellen und der pluripotenten inneren Zellmasse des Blastozysten nachzuweisen (HOUGHTON, 2005).

1.6.2 Gap Junctions in mesenchymalen Zellen und ihre Funktion im Embryo

Die Gastrulation (Abb. 5.2) bezeichnet die Bildung der Keimblätter Ekto-, Ento- und Mesoderm, aus denen im Laufe der Embryogenese die verschiedenen Gewebetypen entstehen. Für diese Arbeit von Bedeutung ist das Mesoderm, aus dem sich u. a. Binde- und Stützgewebe, Skelett-, Darm- und Herzmuskulatur, Blutgefäße, Blut- und Lymphzellen, Nephridien, Nieren, Ei- und Samenleiter entwickeln. Die Prozesse, die zur Bildung des Mesoderms führen, sollen in den folgenden Absätzen konkreter erläutert werden.

Die erste und wichtigste epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) in Embryonen höherer Vertebraten produziert das Mesenchym, welches kondensiert, um das definitive Mesoderm (embryonale Schicht) und das Entoderm (innere Schicht) zu bilden (Gastrulation). EMT ist ein wichtiger embryonaler Mechanismus zur Gewebe-Reorganisation und wird als ein Prozess definiert, der zu einem kompletten Verlust der epithelialen Merkmale von Epithelzellen führt, begleitet vom Erwerb mesenchymaler Charakteristika, wie Vimentin, Myosin und invasive Motilität (HAY, 2005). Der Prozess der Gastrulation wird durch die Primitivrinne zustande gebracht (BELLAIRS, 1986; STERN, 2004), die sich später zurückentwickelt und in großer Anzahl neu synthetisierte mesenchymale Zellen entlang des Rumpfes zurücklässt, woraus sich fast das gesamte embryonale Mesoderm, einschließlich einiger Epithelien sowie Bindegewebe, entwickelt. Das mutmaßliche Mesoderm und Entoderm ruht im Epiblasten und wandert als Primitivrinne-Mesenchym in den Zwischenraum zwischen Epiblast und Hypoblast ein. Primitivrinne- und Somiten-Mesenchym stellen den hauptsächlichen Zell-Ursprung für Arme und Beine der Vertebraten dar (EDE et al., 1977), da die mesenchymale Morphologie die Zellen befähigt, zu jedem Ziel im Embryo zu wandern, wo sie differenzieren und/oder die Differenzierung anderer Zellen induzieren.

Das ausgesonderte Mesoderm (mittleres Keimblatt) enthält sowohl Mesenchym als auch Epithelien von Blutgefäßen und Drüsen und gliedert sich in einem Prozess der Selbstorganisation (EMT) in fünf Teile auf. Der Mittelstreifen des Mesoderms formt sich sogleich zur Chorda dorsalis, die Seitenstreifen formen anschließend die Somiten. Dieser Prozess involviert die mesenchymale-epitheliale Transformation (MET). Die Somiten lösen sich erst in zwei Hauptgruppen von Zellen auf: Sklerotom und Myodermatom. Das Myodermatom gliedert sich weiter in Myotom und Dermatome.

Das Sklerotom-Mesenchym stellt Fibroblasten und Osteoblasten mittels EMT zur Verfügung, welche das Neuralrohr umgeben und eine extrazelluläre Matrix synthetisieren, einschließlich der Knochen und Knorpel, die zum Aufbau der Wirbelsäule notwendig sind (LASH et al., 1957). Die Pakete der Myotome dehnen sich aus und werden zur quergestreiften Körpermuskulatur. Ein Teil der Myoblasten wird später in die Extremitätenknospen auswandern. Die Zellen des Dermatoms breiten sich, an der Innenfläche des

Ektoderms entlangleitend, weiträumig aus, um später teilweise die Muskulatur und die Dermis zu bilden. Die Seitenplatten sparen einen Hohlraum aus. Sie werden zu abgeflachten Blasen, die das Coelom (sek. Leibeshöhle) umhüllt, welches sich später in die Perikardhöhle, die das Herz beherbergt, und die große Leibeshöhle (Pleuroperitonealhöhle) gliedert. Die große Leibeshöhle untergliedert sich weiter in Pleuralhöhle (Lungenraum) und Peritonealhöhle (um den Magen-Darmtrakt). Die Wandung der Seitenplatte, die sich dem Ektoderm anschmiegt (Somatopleura, parietales Mesoderm) wird Rippen- und Bauchfell bilden, die Wandung, die sich dem Urdarm anschmiegt (Splanchnopleura, viscerales Mesoderm), wird die muskulären Außenschichten des Darms und seine Aufhängeeinrichtungen (Mesenterien) hervorbringen. Somiten und Seitenplatten sind durch die Ursegmentstiele miteinander verbunden, aus denen das frühembryonale Urogenitalsystem (Pronephros) hervorgeht. Vorn ventral, wo sich linke und rechte Seitenplatte unterhalb des Urdarms einander nähern, sammeln sich Wanderzellen (Hämangioblasten und Myokardioblasten), die sich zu Herz und Gefäßen organisieren.

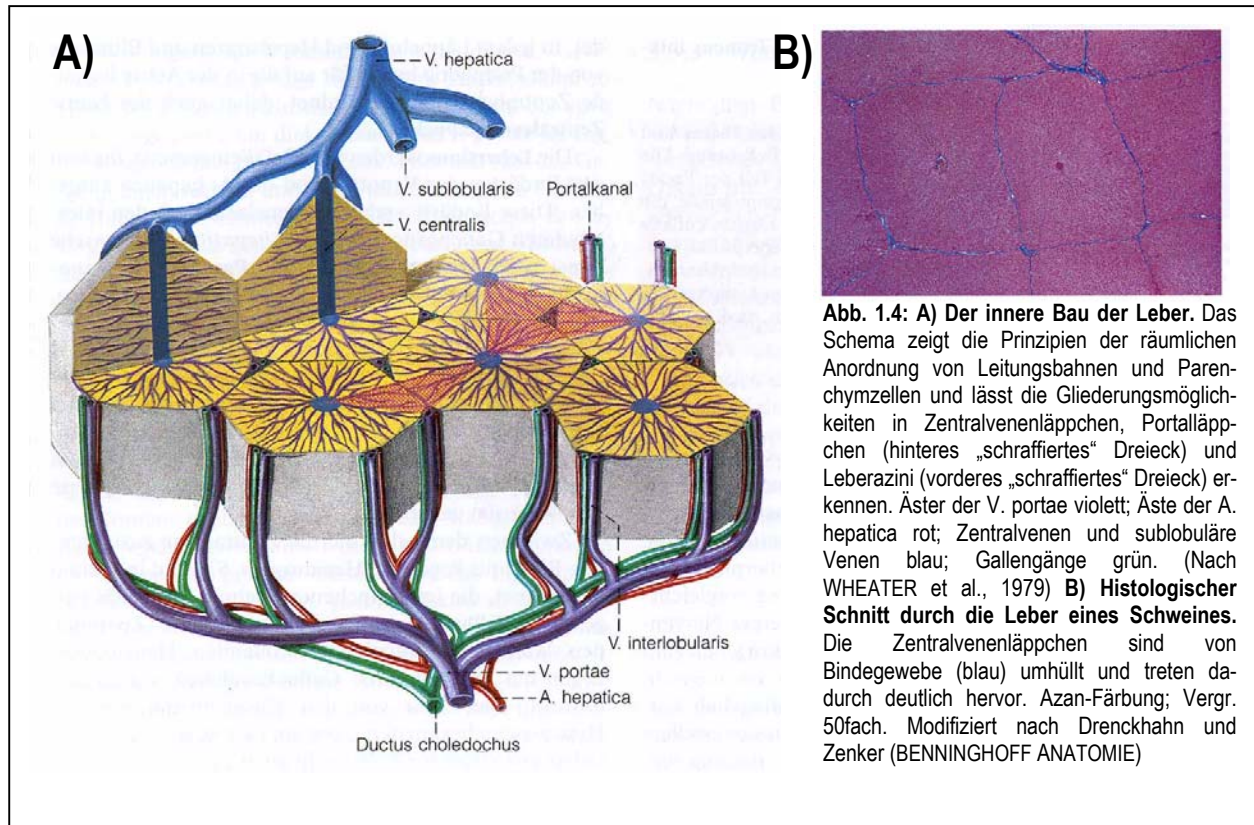
Alle oben aufgeführten Prozesse unterliegen anscheinend dem Gewebe-Reorganisationsprozess in der Embryonalentwicklung, an dem hauptsächlich mesenchymale Zellen beteiligt sind. Die invasive Motilität der mesenchymalen Zellen ist essentiell. Aufgrund der invasiven Motilität und definierter Merkmale kann eine mesenchymale Zelle jede Körperschicht, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) enthält, infiltrieren. In TRELSTAD et al. (1967) wurde beschrieben, dass die einzigen Verbindungen, die mesenchymale Zellen untereinander aufbauen, beim Zusammentreffen zweier Zellen temporäre Gap Junction Kanäle sind. Es ist bis heute nicht bekannt, aus welchen Connexinen diese Gap Junction Kanäle bestehen.

In BUNIELLO et al., 2004 wird beschrieben, dass Connexine vornehmlich in den Geweben exprimiert werden, die vom Ektoderm und/oder Entoderm abstammen.

1.6.3 Gap Junctions in der Leber: Cx26 und Cx32, die maßgeblichen Connexine

Die morphologische Baueinheit der Leber ist das Zentralvenenläppchen, das auf Querschnitten in Form polygonaler Bezirke zu sehen ist. In der Mitte eines solchen Zentralvenenläppchens verläuft die Vena centralis. Die Leberzellen, Hepatozyten, zu Leberzellbalken bzw. Leberzellplatten angeordnet, verlaufen radiär auf die Zentralvene zu. Zwischen ihnen liegen die buchtenreichen Leberkapillaren, die Lebersinus (Vasa sinusoidea), so dass die Leberzellen mindestens an zwei Seiten von Blut umspült werden. In den bindegewebsreichen Lebern werden die Zentralvenenläppchen allseitig von Bindegewebsfasern umhüllt, die sich an den Stellen, an denen Läppchen mit ihren Ecken zusammentreffen, zu kräftigen Bindegewebszwickeln, den Glisson-Dreiecken (Trias hepatica, Glisson-Trias) entfalten. Dieses interlobuläre Bindegewebe hängt mit den Fasersystemen der oberflächlichen Leberkapsel zusammen (Glisson-Kapsel). In den

Bindegewebszwickeln, den periportalen Feldern, findet man regelmäßig die Durchschnitte von Ästen der Vena portae, der Arteria hepatica und der interlobulären Gallengänge („Trias“). Zusätzlich zu den schon erwähnten Hepatozyten beinhaltet die Leber folgende Zelltypen: Ito- (Fettspeicher-) Zellen, Cholangiozyten und Endothelzellen.



1986 wurde die cDNS für das Cx32 Protein beschrieben (KUMAR und GILULA, 1986; PAUL et al., 1986; HEYNKES et al., 1986) und drei Jahre später folgte Connexin26 (ZHANG et al., 1989). Gap Junctions konnten zwischen den Hepatozyten und anderen Zellpopulationen gezeigt werden, wobei die Expression jedoch Zelltyp- und Region-spezifisch ist. So konnte z.B. dargestellt werden, dass die Zellen der Leberkapsel - Ito-Zellen, Cholangiozyten und Endothelzellen - vornehmlich Cx43 exprimieren (RUBIN et al., 1990; BERTHOUD et al., 1992; SÁEZ und LARUSSO, 1993), wohingegen die Hepatozyten nur Cx26 und/oder Cx32 exprimieren (NICHOLSON et al., 1987; TRAUB et al., 1989). Der relative Gehalt an Connexinen, die durch Parenchymzellen exprimiert werden, variiert zwischen den einzelnen Spezies stark. Das ungefähre, relative Verhältnis von Cx32 zu Cx26 konnte in der Maus mit 1:0.5 und in der Ratte mit 1:0.1 bestimmt werden (HERTZBERG und GILULA, 1979; TAKEDA et al., 1988; NICHOLSON et al., 1987; TRAUB et al., 1989). Ferner konnte in der Rattenleber gezeigt werden, dass die Cx32 Protein Verteilung über den Leberazinus homogen

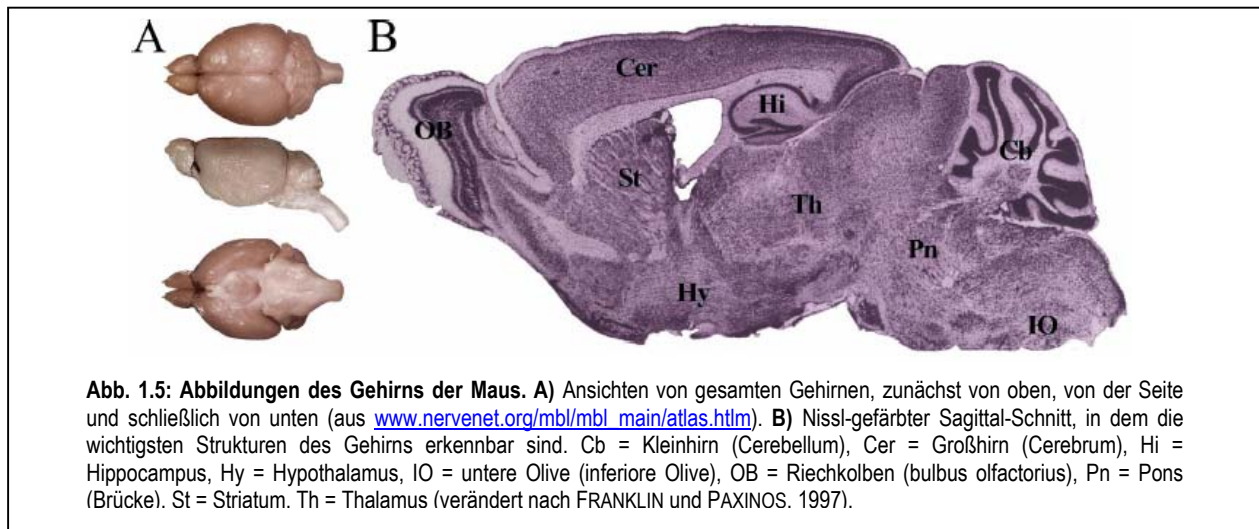
und die Cx26 Protein Verteilung dagegen heterogen, zugunsten der Periportalfelder, verläuft (TRAUB et al., 1989; BERTHOUD et al., 1992). Im periportalen Bereich der Ratte sind die Hepatozyten mit einer höheren Glycogen-Aktivität zu finden (GUMUCIO und MILLER, 1981; JUNGEMAN und KATZ, 1989). Diese Verteilung konnte in den Lebern von Mäusen bisher nicht gezeigt werden.

1.6.4 Gap Junctions im Gehirn: Kontroverse Diskussion um Cx26

Aus WHEATER et al., 1987: „Aufgabe des Nervensystems ist es, Reize aus der inneren und äußeren Umwelt zu empfangen, auszuwerten und so in ein Beziehungsgefüge einzubauen, dass angemessene, koordinierte Reaktionen in den verschiedenen Zielorganen erfolgen. Das Nervensystem besteht aus einem zusammenhängenden Netzwerk spezialisierter Nervenzellen, den Neuronen. Die Erregbarkeit von Neuronen wird durch ein Ionengefälle über die äußere Zellmembran bewirkt. Elektrische Impulse führen zu einer Öffnung spannungssensitiver Ionenkanäle, wodurch sich die Membrandurchlässigkeit ändert. Dadurch wird das Ionengefälle umgekehrt und die äußere Zellmembran depolarisiert. Eine Depolarisationswelle, auch Aktionspotential genannt, breitet sich über die äußere Zellmembran aus. Dieser Vorgang wird von der Repolarisation abgelöst, in welcher die Zellmembran ihr Ruhepotential wiederherstellt. Das Nervensystem wird anatomisch in das zentrale (ZNS) und das periphere (PNS) Nervensystem eingeteilt. Zum ZNS zählt man das Gehirn (siehe Abb. 1.5) mit Retina und Rückenmark, das PNS beschreibt das Nervengewebe außerhalb dieser Bereiche. Das Gehirn besteht aus verschiedenen Neuronen mit ihren Fortsätzen, den Axonen und Dendriten, sowie den Stützzellen, der Neuroglia, die ihrerseits weiter unterteilt wird. Die graue Substanz enthält hauptsächlich die Zellkörper der Neurone, während die weiße Substanz deren Fortsätze und Zellen der Neuroglia beinhaltet.“

Alle Gliazelltypen und bestimmte Neuronen Populationen (DERMIETZEL und SPRAY, 1992) bilden Gap Junctions aus. Im Grunde genommen werden Astrozyten in allen Regionen des ZNS über Gap Junctions miteinander verbunden und bilden so ein ausgedehntes Netzwerk (RASH et al., 2000). Eine mögliche Funktion ist der Austausch von Metaboliten, wie z.B. die Zerstreuung der durch Astrozyten aufgenommenen K^+ -Ionen nach neuronaler Aktivität (ORKAND et al., 1966). Eine zweite mögliche Funktion involviert die interzelluläre Kommunikation zwischen Astrozyten. Als Beispiel kann man die Ausdehnung von Ca^{2+} -Wellen zwischen den Astrozyten aufzeigen, die z. T. von der Connexin Expression abhängig ist (GOODENOUGH und PAUL, 2003). Ein Astrozyten Netzwerk könnte über die Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen die synaptische Aktivität über beträchtliche Entfernungen beeinflussen, da die hierzu erforderliche Glutamat Freisetzung eine Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweist (HAYDON, 2001). Schließlich konnte gezeigt werden, dass Astrozyten teilweise interzelluläre Kanäle direkt mit Neuronen etablieren können, was wiederum ein zusätzlichen

Regulations-Mechanismus der neuronalen Aktivität über Gliazellen darstellen könnte (NEDERGAARD, 1994; ALVAREZ-MAUBECIN et al., 2000).



Die Expression von Connexinen in Gliazellen des ZNS ist sehr komplex. In Astrozyten wurden drei Connexine beschrieben [Cx26 (NAGY et al., 2001), Cx30 (KUNZELMANN et al., 1999), und Cx43 (GIAUME et al., 1991)]. Zur Expression von Cx26 im Gehirn liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Eine starke Cx26 Expression im adulten Gehirn von Säugetieren wurde von NAGY et al., 2001 beschrieben, obwohl in anderen Studien bereits die Abwesenheit einer Cx26 Expression gezeigt wurde (DERMIETZEL et al., 1989; NADARAJAH et al., 1997). Die meisten Analysen bestätigten eine Cx26 Lokalisation in den Meningen (Hirnhäuten) (FILIPPOV et al., 2003). Einige Daten zeigten eine Cx26 Expression entweder in Neuronen (NADARAJAH et al., 1997; VENANCE et al., 2000; BITTMAN et al., 2002) oder beschränkt auf Gap Junctions zwischen Astrozyten (NAGY et al., 2001) oder zeigten eben keine Expression im adulten Gehirn (DERMIETZEL et al., 1989). In Oligodendrozyten wurden die Gap Junction Proteine Cx29 (ALTEVOGT et al., 2002), Cx32 (DERMIETZEL et al., 1989), und Cx47 (MENICHELLA et al., 2003) beschrieben.

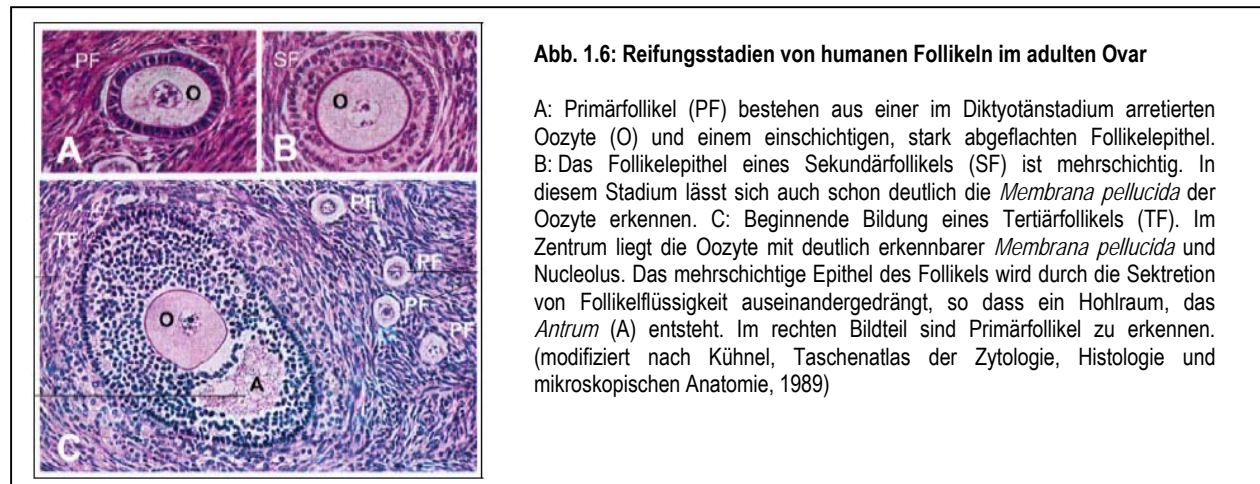
1.6.5 Gap Junctions in den Gonaden

1.6.5.1 Ovarien und Cx43

In der Rindenzone des Ovars erfolgt die Reifung der Keimzellen. Während die Vermehrungsphase der Oogenese vor der Geburt abgeschlossen ist, erfolgt die Reifungsperiode unter Einbeziehung des umgebenden Bindegewebes in Form der Ausbildung und Reifung eines Follikels zum größten Teil erst nach der Geburt. In der Fetalzeit gebildete Oogonien sind im Ovar als ruhende Primärfollikel erkennbar (Abb. 1.6 A). Mit

Einsetzen der Geschlechtsreife beginnt die weitere Follikelreifung. Sekundärfollikel (Abb. 1.6 B) zeichnen sich durch ein mehrschichtiges, prismatisches Epithel aus, zudem entsteht zwischen Oozyte und Follikelzellen die *Membrana pellucida*. Im Zuge der Reifung entstehen flüssigkeitsgefüllte Lücken, die sich schließlich zu einem Hohlraum (*Antrum*) vereinigen (A in Abb. 1.6 C). Im Tertiärfollikel ragt die Oozyte schließlich auf einem Hügel aus Follikelepithelzellen (*Cumulus oophorus*) ins *Antrum* hinein. Das Innere des *Antrums* wird von Granulosazellen ausgekleidet, einer Lage aus abgeflachten Follikelzellen. Während die Oozyte ausschließlich Cx37 ausprägt (KIDDER und MHAWI, 2002), exprimieren die Zellen des Follikelepipithels mindestens sechs Connexine, einschließlich Cx43 (WRIGHT et al., 2001).

Das in Granulosazellen ausgeprägte Cx43 Protein (OKUMA et al., 1996) zeigt eine veränderte Phosphorylierung und Expression in Abhängigkeit von hormonellen Signalen (GRANOT und DEKEL, 1998). Neben der Versorgung der Oozyte mit Nährstoffen scheint die Arretierung der Meiose mittels Erhaltung eines hohen cAMP Spiegels die wesentliche Aufgabe von Cx43 Gap Junctions während der Follikelreifung zu sein. Nach Stimulation mit luteinisierendem Hormon (LH) erfährt Cx43 eine Phosphorylierung und anschließende Reduktion der Expression (GRANOT und DEKEL, 1998). Diese scheint nicht in erster Linie durch verstärkte Degradation, sondern durch Reduktion der Cx43 mRNS Translation zu erfolgen (KALMA et al., 2004).



Analysen von Cx43 defizienten Ovarien zeigten eine starke Einschränkung der Follikelreifung, nur Primärfollikel mit einem einschichtigen Epithel wurden gebildet (JUNEJA et al., 1999). Obwohl Follikelzellen auch andere Connexine exprimieren, scheint eine Gap Junction vermittelte Kommunikation mittels Cx43 für die Reifung essentiell zu sein (ACKERT et al., 2001; GITTENS et al., 2003). Nach der Ovulation eines reifen Graafschen Follikels erschlafft der leere Follikel und wird durch das Eindringen von Blut zum *Corpus*

rubrum. Dieser entwickelt sich durch Proliferation der Granulosazellen zum *Corpus luteum*. Im Fall einer Schwangerschaft bleibt dieser zunächst bestehen und produziert Progesteron und Östrogene. Letztlich erfolgt eine Umwandlung zu Narbengewebe (*Corpus albicans*) und schließlich dessen Resorption.

1.6.5.2 Hoden und Cx43

Der Hoden ist von einer Kapsel, *Tunica albuginea*, umgeben, die aus derbem, faserigem Bindegewebe besteht. Sie enthält viele glatte Muskelzellen, die für eine Spannung der Kapsel sorgen. Das von der *Tunica albuginea* umschlossene Hodengewebe wird durch zarte bindegewebige Septen, *Septula testis*, in Hodenläppchen (*Lobuli testis*) gekammert. Die *Septula testis* führen Blut- und Lymphgefäße und laufen radiär von der *Tunica albuginea* auf das Rete testis zu. Die *Lobuli testis* bilden das eigentliche Hodenparenchym. Ein *Lobulus testis* besteht aus einem mehr oder mehreren stark aufgekäuerten Samenkanälchen, *Tubuli seminiferi contorti*, die Schlaufen bilden, deren Beginn und Ende sich in die Räume des Rete testis öffnen. Zwischen den Samenkanälchen gibt es ein ausgedehntes interstitielles Gewebe, in dem hormonbildende Leydig-Zellen, Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven vorkommen.

Die Samenkanälchen, *Tubuli seminiferi*, bestehen aus einem Keimepithel und einer myofibrösen Hülle, *Lamina propria*. Das Keimepithel wird aus Keimzellen und Stützzellen, den so genannten Sertoli-Zellen, aufgebaut. Während der Spermatogenese vermehren sich die Keimzellen im Keimepithel, machen die Reifeteilungen durch und differenzieren zu Samenzellen. Die Entwicklung beginnt mit den Spermatogonien außen an der Basalmembran des Samenkanälchens und schreitet über Spermatozyten I und II bis zu den Spermatiden fort. Die reifen Spermatiden säumen das Lumen des Kanälchens.

In der Testis wurde Cx43 zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen, zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen und zwischen Leydig-Zellen lokalisiert (TAN et al., 1996).

1.6.6 Gap Junctions in der Hypophyse

1.6.6.1 Das Hypophysäre System: Aufgabe und Funktion

Die Hypophyse, Hypophysis oder Glandula pituitaria, ist eine lebenswichtige endokrine Drüse. Sie ist klein, der größte Anteil des Organs liegt in der Tiefe des Schädels (Abb. 1.7 A) versteckt und produziert zahlreiche Hormone, von denen mehrere auf andere innersekretorische Drüsen einwirken, so dass das Organ als eine übergeordnete Zentrale für die Steuerung des endokrinen Geschehens angesehen werden kann. Die Hypophyse wird ihrerseits wieder durch Stoffe gesteuert, die im Zwischenhirn gebildet und auf dem Blutweg über ein spezielles Pfortadersystem an die Drüse herangebracht werden.

Die Hypophyse besteht aus zwei Anteilen, Adenohypophyse und Neurohypophyse, die entwicklungsge-schichtlich aus verschiedenen Anlagen hervorgehen: Die Adenohypophyse zerfällt in eine Pars distalis (Vorderlappen), eine Pars infundibularis (Trichterlappen) und eine Pars intermedia (Zwischen- oder Mittel-lappen). Die Neurohypophyse umfasst die Pars nervosa (Hinterlappen) und das Infundibulum.

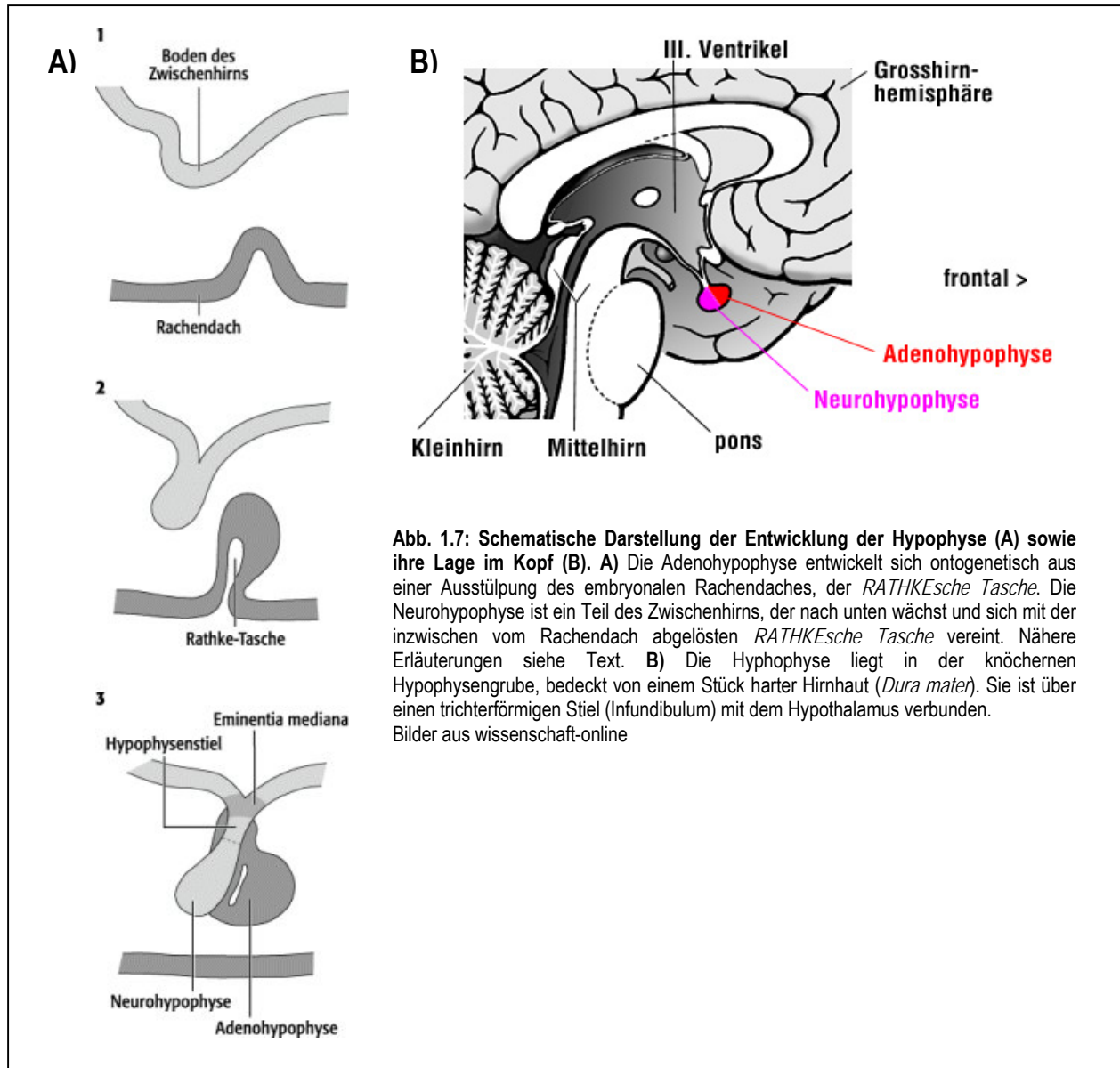
Die Entwicklung (Abb. 1.7 B) der Adenohypophyse beginnt in einem frühen Embryonalstadium, indem eine nach oben gerichtete Ausstülpung des Epithels auftritt. Diese als Hypophysentasche oder RATHKEsche Tasche bezeichnete Ausstülpung wird schnell größer. Sie erreicht den Boden des Zwischenhirns und legt sich ihm an. Mit zunehmendem Wachstum des Embryos entfernt sich die RATHKEsche Tasche immer weiter vom Dach der Mundbucht. Während das dem Zwischenhirn anliegende Epithel proliferiert, wird der Stiel dünner. Er wird vom Mesenchym umwachsen und schließlich zurückge-bildet.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung vergrößert sich die dem Zwischenhirn anliegende RATHKEsche Tasche zu einem sackartigen Gebilde mit großem Lumen. Die nach rostral und oben weisenden Teile der Wand dieses Epithelbläschens proliferieren kräftig und liefern das Material für die Pars distalis und die Pars tuberalis der Adenohypophyse. Der der Neurohypophyse anliegende hintere Teil der Wand wächst da-gegen bedeutend weniger. Aus ihm geht die Pars intermedia (Zwischenlappen) hervor. Die zunächst große Hypophysenhöhle wird während der geschilderten Entwicklung immer kleiner.

Die Entwicklung der Neurohypophyse beginnt nach der Anlagerung der RATHKEsche Tasche an den Boden des III. Ventrikels mit einer Verdickung des Epithels. Die Neurohypophyse lässt sich schon während der Embryonalzeit durch ihre faserige Struktur von der aus Epithelzellen aufgebauten Adenohypophyse unterscheiden.

In der Adenohypophyse kommen drei Hauptgruppen von Drüsenzellen vor, die als azidophile, basophile und chromophobe Zellen bezeichnet werden. In den Drüsenzellen werden die verschiedenen Hormone ge-bildet, die entweder Polypeptidcharakter haben oder Glykoproteine sind. Die sogenannten glandotropen Hormone wirken auf nachgeschaltete Hormondrüsen ein [Prolaktin (LTH), das Follitropin (FSH; follikelstimu-lierendes Hormon), das Lutropin (LH; luteinisierendes Hormon), das Thyrotropin (TSH) und das Corticotro-pin (ACTH)]. Die andere Gruppe umfasst sogenannte Effektorhormone, welche direkt, ohne Zwischen-schalten einer weiteren Hormondrüse auf die Zielzellen einwirken [Somatotropin (STH), das Melanotropin (MSH), das Lipotropin (LPH) sowie das Prohormon Pro-Opio-Melano-Cortin (POMC)]. Prolaktin stimuliert die Proliferation und Sekretbildung in der Brustdrüse, wohingegen das Wachstumshormon (Somatotropin) für die Stimulation des Körperwachstums zuständig ist. Die gonadotropen Hormone (FSH und LH) wirken

auf die Gonaden und stimulieren Follikelreifung bzw. Spermatogenese sowie die Hormonbildung in den Zwischenzellen von Ovar und Hoden. Die hier nicht aufgeführten Hormonwirkungen sind in einer Tabelle im Anhang aufgelistet.



Die Neurohypophyse umfasst den eigentlichen Hinterlappen, Pars nervosa, und das Infundibulum samt Eminentia mediana. Der Hypophysenhinterlappen ist keine hormonbildende Drüse, sondern dient als Stapelorgan und Abgabeort für Hormone, die im Hypothalamus gebildet werden. Das Gewebe der Neurohypophyse besteht aus marklosen Nervenfasern, wobei die meisten Nervenzellen, deren Neuriten im Infundibulum oder in der Pars nervosa enden, neurosekretorisch tätig sind, d.h. Hormone bilden, die in der

Nervenfaser an den Ort ihrer Abgabe ins Blut herantransportiert werden. Es lassen sich zwei große Systeme neurosekretorischer Fasern morphologisch und biochemisch unterscheiden: Nervenfasern, die zum einen Oxytozin oder Vasopressin und zum anderen die sog. Releasing- bzw. Inhibiting-Hormone enthalten. Oxytozin bewirkt die Kontraktion sensibilisierter glatter Muskelfasern z.B. in Uterus und Mamma und Vasopressin fördert die Wasserretention. Als Releasing-Hormon sei hier nur das GnRH (Luteinizing hormone-releasing hormone) erwähnt, welches die Sekretion von LH und FSH in der Adenohypophyse fördert und die Ovulation induziert.

Gap Junctions in Zellen der Hypophyse wurde erstmals durch FLETCHER et al. (1975) und ABRAHAM et al. (1979) in Ratten und beschrieben. Die Gap Junction vermittelte Kommunikation innerhalb der Drüse ist, zur Sicherstellung einer adäquaten Zell-Zell-Koordination sowie physiologischen Synchronisation (angemessene und zeitliche Hormonsekretion), unentbehrlich, weil in Säugetieren die Innervation der Adenohypophyse fehlt. In der Ratte werden Cx43 (MEDA et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1993) und Cx26 (MEDA et al., 1993) in der Adenohypophyse exprimiert. Analysen im Nerz zeigen eine Cx43 Expression in follikulären Sternzellen, die mit dem schwankenden Prolaktin (PRL)-Gehalt während des Reproduktionszyklus variiert (VITALE et al., 2001). SHIRASAWA et al. (2004) zeigte, dass sowohl das Portalgefäßsystem als auch das Gap Junction vermittelte Netzwerk der follikulären Sternzellen für die Hormonfreisetzung in der Ratte notwendig sind. Granula-Zellen, welche direkt mit der Zellmembran der follikulären Sternzellen assoziiert sind, können Hormone durch Kommunikation der Gap Junction Kanäle koordiniert sezernieren, wohingegen die Granula-Zellen, die weiter von den follikulären Sternzellen entfernt liegen, die Hormone nur über die Releasing-Hormone des Portalgefäßsystems freisetzen können (SHIRASAWA et al., 2004). Das Gap Junction Netzwerk der follikulären Sternzellen ist somit für die Reifung und Regulation des hypophysären Drüsensystems notwendig, zusätzlich zum Hypothalamus-Hypophysen-System.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Expressionsmuster und biophysikalischen Eigenschaften der Connexine legen ein hohes Maß an funktioneller Spezialisierung nahe, demgegenüber stehen die Hinweise auf eine funktionelle Redundanz unter den Mitgliedern der Genfamilie. Der Ersatz der kodierenden Region eines Connexin Gens gegen die eines anderen Connexin Gens ermöglicht somit die Erforschung gemeinsamer und unterschiedlicher physiologischer Eigenschaften der beiden Gene.

Im Rahmen zweier Knock-In-Mauslinien sollte eben diese funktionelle Ersetzbarkeit der Connexine Cx26-Cx32 und Cx43-Cx26 im Allgemeinen – Ausbildung und Erhaltung der Funktionalität verschiedener Gewebe bzw. Organe - und im Besonderen – funktionelle Notwendigkeit in der Embryonalentwicklung - erforscht werden:

- I. Cx26KILacZKICx32
- II. Cx43KICx26

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht Connexin26, welches in der Multigenfamilie das Connexin mit der kürzesten carboxyterminalen Domäne ist und deshalb die größte Wahrscheinlichkeit anderer Kopplungs- und Regulationseigenschaften aufweist. (1) Die kodierende Region des Cx26 Gens wurde zum einen durch die von Cx32 ersetzt, welches unter dem Promoter von Cx26 reguliert wird. Das Cx32 Gen wurde für diese Fragestellung ausgewählt, da es gut charakterisiert ist, in vielen Geweben und Zelltypen wie der Leber, Niere und Testis gemeinsam mit Cx26 exprimiert wird (ZHANG und NICHOLSON, 1989) und *in vitro* heterotypische Kanäle mit Cx26 bilden kann (ELFGANG et al., 1995). In Anbetracht der zuvor beschriebenen Aspekte ist eine Aufhebung der embryonalen Letalität der Cx26^{-/-}-Tiere in dieser Konstellation am wahrscheinlichsten. Außerdem sollte die Cx26 Expression im Allgemeinen und in kontrovers diskutierten Geweben wie dem Gehirn durch ein zusätzlich eingebrachtes LacZ-Reportergen geklärt werden. (2) Im Fall der zweiten Mauslinie sollte jedoch Cx26 die kodierende Region eines zweiten Connexins ersetzen. Aufgrund schon existierender Knock-In-Linien im Cx43 Locus und der Vergleichsmöglichkeiten dieser Linien untereinander, wurde Cx26 in die kodierende Region von Cx43 eingebracht.

Folgende Schwerpunkte wurden bei den Analysen der Mauslinien zugrunde gelegt:

Kann die beschriebene Cx26 Expression durch ein Reportergen bestätigt werden?

In welchen Zelltypen wird Cx26 im Gehirn exprimiert? Meningen oder Astrozyten?

Kann Cx32 in homozygoten Tieren die Funktion von Cx26 in der Plazenta ersetzen?

Kann Cx43 auch durch Cx26 – wie Cx32 und Cx40 - funktionell im Herz ersetzt werden?

Können die Phänotypen der Cx43 Knock-In-Mäuse miteinander verglichen werden?

2 MATERIAL

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität (p.A.) verwendet. Enzyme und Nukleotide wurden von den Firmen Roche, New England BioLabs, Promega oder Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Radioaktiv markierte Chemikalien stammten von der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Sequenzierungen von Plasmiden erfolgten durch die Firmen MWG oder Agowa.

2.1 Allgemeine Lösungen

PBS-	137 mM	8,0 g NaCl (Merck #1.06404)
	2,7 mM	0,2 g KCl (Merck #1.04936)
	8,1 mM	1,44 g Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O (Merck #1.06576)
	1,5 mM	0,2 g KH ₂ PO ₄ (Merck #1.04873)
	ad 1 l mit ddH ₂ O	

2.2 Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit ddH₂O angesetzt und bei RT gelagert.

Lösungen, welche man für Arbeiten mit RNS benötigte, wurden durch Zugabe von 2 % (v/v) Dimethylpyrrolidonecarbonat (DMPC) (Sigma #D-5520), anschließendem Rühren üN bei RT und abschließendem einstündigen Autoklavieren, von RNasen befreit.

Alkali-Lösung 1	50 mM	4,5 g D(+)-Glucose (Merck #1.08337)
	25 mM	1,51 g Tris (ICN #819623)
	10 mM	1,86 g EDTA (Sigma #E-5134)
Alkali-Lösung 2	0,2 M	4 g NaOH (J.T. Baker #0402)
	1 %	50 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	ad 500 ml	
Alkali-Lösung 3	3 M	147,3 g Kaliumacetat (Merck #1.04820)
	5 M	57,5 ml Essigsäure (Merck #1.00062)
	ad 500 ml	

2. MATERIAL

Ammoniumacetat	5 M	1,93 g Ammoniumacetat (Merck) ad 5 ml ddH ₂ O, pH 4.5
Denhardts (50x)	1 %	5 g Ficoll (Sigma)
	1 %	5 g Polyvinylpyrrolidon (Sigma)
	1 %	5 g BSA (Sigma, Pentose Fraktion)
		Ad 500 ml ddH ₂ O
DMPC-Wasser	0,2 % (v/v)	2 ml Dimethylpyrocarbonat (DMPC, Sigma) in 1 l ddH ₂ O 12-24 h rühren lassen, dann 1 h autoklavieren
DNS-Ladepuffer (6 x)	0,25 %	125 mg Bromphenolblau (Serva #15375)
	0,25 %	125 mg Xylenzanol (Sigma #X-2751)
	30 %	15 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)
		ad 50 ml
EtBr-Stammlösung	1 %	500 mg Ethidiumbromid (Merck)
		50 ml ddH ₂ O
		Lichtgeschützte Lagerung bei RT
Formamid deion.		Formamid mit 5 % (w/v) Ionenaustauscherharz (Biorad) 30 min. bei RT rühren, durch Faltenfilter aufreinigen und bei - 20°C aliquotiert lagern
Glaswolle, silikonisiert		durch Schwenken in Silikonisierer (Roth #6287.1) 1:60 in ddH ₂ O, 1 Woche abdampfen lassen und 10 min. bei 120°C backen
Laird-Puffer	0,1 M	12,1 g Tris (ICN #819623)
	5 mM	1,86 g EDTA (Sigma #E-5134)
	0,2 M	11,69 g NaCl (Merck #1.06404)
	0,2 %	20 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		ad 1 l; zur Schwanzspitzenlyse in 400 µl, frische Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lösung

2. MATERIAL

Lysis-Puffer	0,2 M	2,42 g Tris (ICN #819623)
	0,1 M	3,72 g EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	10 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		ad 100 ml; pH 8,0; vor Gebrauch je ml Zugabe von 10 µl Proteinase K-Lösung
Lysis-Puffer (ES)	50 mM	0,3 g NaCl (Merck #1.06404)
	20 mM	0,24 g Tris (ICN #819623)
	100 mM	3,72 g EDTA (Sigma #E-5134)
	0,5 %	500 µl SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	2 mM	29 mg CaCl ₂ (Merck #1.02382)
		ad 100 ml; pH 8,0; steril filtrieren; vor Gebrauch Zugabe von 50 µl Proteinase K-Lösung und 100 µl RNase 2000 pro ml
Lysis-Puffer (Gewebe)	200 mM	1,21 g Tris-HCl (ICN)
	100 mM	1,86 g EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	50 µl SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	200 µg/ml	500 µl Proteinase K (Stock: 20 mg/ml)
	10 µg/ml	250 µl RNase2000 (Stock: 2 mg/ml)
		Ad 50 ml ddH ₂ O
MOPS-Puffer (10x)	0,2 M	Morpholinopropansulfonsäure
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
		pH 7,0
		1 h autoklavieren, lichtgeschützt bei 4°C lagern
NaCl	3 M	17,5 g NaCl (Merck #1.06404)
		ad 100 ml
NaOH	2 M	0,8 g NaOH (Merck) ad 10 ml ddH ₂ O
Natriumacetat	3 M	24,6 g Natriumacetat (Merck #1.06268)
		ad 100 ml; pH 4,8; 1 h autoklavieren

2. MATERIAL

Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	1 g Proteinase K (Roche #1092766) ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
RNase 2000	0,2 % 2000 U/ml	20 mg RNase A (Roche #109142) 20.000 U RNase T1 (Roche #109193) ad 10 ml mit ddH ₂ O; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
RNS-Denaturierungspuffer	2,25 µl 2,25 µl 11,25 µl 4 µl	MOPS-Puffer (10x) Ethidiumbromid (400 µg/µl) Formamid (deion.) Formaldehyd (35 %)
RNS-Ladepuffer (10x)	0,4 % 0,4 % 1 mM 50 %	Bromphenolblau (v/v) Xylencyanol (v/v) EDTA Glyzerin (v/v) in DMPC-H ₂ O, bei 4°C lagern
SBL-20x SSC Transfer-Puffer	3 M 0,3 M	350,6 g NaCl (Merck) 214,3 g Na ₃ -Citrat * 5,5 H ₂ O Ad 2 l, pH 7.0 (entspricht 20x SSC-Lösung)
SBL-alkalischer Transfer-Puffer	1,5 M 0,5 M	175,32 g NaCl (Merck) 40 g NaOH (Merck) Ad 2 l (entspricht Denaturierungs-Lösung)
SBL-Denaturierungs-Lösung	1,5 M 0,5 M	175,3 g NaCl (Merck #1.06404) 40 g NaOH (J.T. Baker #0402) ad 2 l
SBL-Depurinierungs-Lösung	0,25 M	24 ml Salzsäure, 32 % (Merck #1.00319) ad 1 l
SBL-Hybridisierungslösung		entspricht der Vorhybridisierungslösung plus radio- aktiv markierter SBL-Sonde
SBL-Neutralisierungslösung	1,5 M 0,5 M	175,32 g NaCl (Merck) 121,14 g Tris (ICN) Ad 2 l ddH ₂ O

2. MATERIAL

SBL-Vorhybridierungs- Lösung (50 % Formamid)	25 % (v/v) 50 % (v/v) 10 % (v/v) 5 % (v/v) 10 % (v/v) 50 mg/ml	25 ml 20x SSC 50 ml Formamid (Fluka) deion. 10 ml 50x Denhardts 5 ml 10 % SDS 10 ml ddH ₂ O 500 µl Heringssperma-DNS (5 min. kochen; 5 min. auf Eis), Lagerung bei -20°C, Lösung vor Gebrauch auf 42°C erwärmen, ca. 15-20 ml pro große Röhre
SBL-Waschlösung 2x SSC/0,1 % SDS	100 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS (Fluka) Ad 1 l ddH ₂ O
SBL-Waschlösung 1x SSC/0,1 % SDS	50 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS (Fluka) Ad 1 l ddH ₂ O
SBL-Waschlösung 0,5x SSC/0,1 % SDS	25 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS (Fluka) Ad 1 l ddH ₂ O
SBL-Waschlösung 0,1x SSC/0,1 % SDS	5 ml 10 ml	20x SSC 10 % SDS (Fluka) Ad 1 l ddH ₂ O
Sephadex G50	Zu 30 g Sephadex G50 (Pharmacia #17-0573-03) werden 300 ml TE-Puffer gegeben, üN bei RT quellen gelassen und schließlich der überschüssige TE-Puffer durch frischen ersetzt (1:1); 1 h autoklavieren	
SSC (20 x)	3 M 0,3 M	175,3 g NaCl (Merck #1.06404) 107,15 g Trinatriumcitrat * 5,5H ₂ O (Merck #1.06431) ad 1 l; pH 7,0

2. MATERIAL

TBE (10 x)	900 mM	109 g Tris (ICN #819623)
	900 mM	55,6 g Borsäure (Merck #1.00165)
	25 mM	0,93 g EDTA (Sigma #E-5134)
		ad 1 l; pH 8,3
TE-Puffer	10 mM	121 mg Tris (ICN #819623)
	1 mM	37,2 mg EDTA (Sigma #E-5134)
		ad 100 ml; pH 8,0; 1 h autoklavieren

2.3 Lösungen für die Bakterienkultur

Ampizillin-Stammlösung	5 %	2,5 g Ampizillin (Roche #835269)
		ad 50 ml; steril filtrierte Aliquots bei -20°C lagern; Endkonzentration in Selektionsmedien: 50 µg/ml
LB-Agar		1 l LB-Medium
	1,5 %	15 g Dunkel-Agar (Difco #0138-17-6) 20 min. autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C
LB-Medium	1 %	10 g NaCl (Merck #1.06404)
	1 %	10 g Trypton (Difco #0123-17-3)
	0,5 %	5 g Hefe-Extrakt (Difco #0127-17-9)
		ad 1 l; mit ~ 2 ml 1 N NaOH auf pH ~ 7,4 einstellen, 20 min. autoklavieren
Tetrazyklin-Stammlösung	2,5 %	1,25 g Tetrazyklin (Sigma #T-3258)
		ad 50 ml mit Ethanol; Aliquots bei -20°C lagern; Endkonzentration in Selektionsmedien: 12,5 µg/ml
TFB I	30 mM	295 mg Kaliumacetat (Merck #1.04820)
	50 mM	809 mg MnCl ₂ * 2H ₂ O (Merck #1.05934)
	100 mM	1,47 g CaCl ₂ * 2H ₂ O (Merck #1.02382)
	100 mM	1,21 g RbCl (Roth #4471.1)
	15 %	15 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)
		ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 5,8; Lagerung bei 4°C

2. MATERIAL

TFB II	10 mM	209 mg Na-MOPS (Sigma #M-9381)
	75 mM	1,1 g CaCl ₂ * 2H ₂ O (Merck #1.02382)
	10 mM	121 mg RbCl (Roth #4471.1)
	15 %	15 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 7,0; Lagerung bei 4°C	

2.4 Lösungen für die Zellkultur und Blastozysten-Injektion

β-ME-Stock	0,7 %	0,3 ml 2-Mercaptoethanol (Sigma #M-7522)
	ad 42,6 ml mit ZK-Wasser (Sigma #W-3500), steril filtrieren; Aliquots à 1,2 ml bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar	
BBS, 2-fach	50 mM	533 mg BES (Sigma #B-6266)
	280 mM	800 mg NaCl (Merck #1.06404)
	1,5 mM	28 mg Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O (Merck #1.06576)
	ad 50 ml, pH 6,95; steril filtrieren; Aliquots à 1 ml bei -20 °C etwa 3 Monate haltbar	
CaCl ₂ -Lösung	250 mM	1,84 g CaCl ₂ (Merck #1.02382)
	ad 50 ml; steril filtrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern	
ES-EDTA-Lösung	5 mM	0,925 g EDTA (Sigma #E-5134)
	zu 500 ml ES-PBS- (Sigma #D-8537), pH 7-8 durch Zugabe von 200 µl 10 N NaOH; 1 h autoklavieren	
ES-Einfriermedium	17,5 ml ES-WT-Medium	
	20 %	2,5 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
	20 %	5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck #1.16743)
	Aliquot bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar	
ES-Puro-Medium	579 ml ES-WT-Medium	
	1,2 µg/ml	1,25 ml Puromyzin-Stock
	Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen	
ES-Selektionsmedium	579 ml	ES-WT-Medium
	4 ml	G418-Stock (350 µg/ml)
	Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen	

2. MATERIAL

ES-Trypsin		400 ml ES-PBS ⁻ (Sigma #D-8537)
	1 mM	100 ml ES-EDTA-Lösung
	1 %	5 ml Chicken Serum (Gibco BRL #16110-003)
	0,025 %	5 ml Trypsin, 2,5 % (Gibco BRL #25090-028)
		Aliquots à 50 ml bei -20°C lagern
ES-WT-Medium		500 ml Glasgow-MEM (Biochrom AG #F 0525)
	5 %	28 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
	5 %	28 ml NCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #N-4637)
	1 mM	5,4 ml Na-Pyruvat, 100 mM (Sigma #S-8636)
	1 x	5,4 ml Pen/Strep, 100x (Sigma #P-0781)
	2 mM	5,4 ml Glutamin, 200 mM (Sigma #G-7513)
	1 x	5,4 ml Aminosäuren, 100x (Sigma #M-7145)
	0,1 %	550 µl LIF (GÜLDENAGEL, Doktorarbeit 2001)
	0,007 %	550 µl β-ME-Stock
		Aliquotierte Zutaten unter einer Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
FSH-Lösung	50 U/ml	5000 U Pregnant Mare Serum (Calbiochem #367222) ad 100 ml mit isotonischer NaCl-Lösung; steril filtrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C ca. 1 Jahr haltbar
G418-Stock	50 mg/ml	aktiv G418 Sulfat (PAA #P27-011)
	100 mM	PIPES (Sigma #P-3768)
		lösen von 10 g G418 und ausgerechneter Menge PIPES, so dass eine Lösung entsteht mit 100 mM PIPES und aktivem G418 von 50 mg/ml; steril filtrieren; Aliquots à 10 ml bei -20°C lagern
Gelatine-Stock	1 %	5 g Gelatine (Sigma #G-6144)
		Zugabe von 500 ml ZK-Wasser (Sigma #W-3500), 1 h autoklavieren; die Lösung mischen und nochmals 1 h autoklavieren; Lösung ist bei 4°C ca. ein Jahr lagerbar. Zur Herstellung der 0,1 %-igen Arbeitslösung wird eine Verdünnung in ZK-Wasser (Sigma #W-3500) hergestellt

2. MATERIAL

HBS-Puffer		100 ml ES-PBS ⁻ (Sigma #D-8537)
	20 mM	2 ml HEPES, 1 M (Gibco BRL #15630-056)
	2,5 M	240 µl Glucose, 100x (Gibco BRL #19004-019)
		Aliquots à 10 ml bei -20°C lagerbar
hCG-Lösung	50 U/ml	1 Cap hCG-Stock
		ad 10 ml mit isotonischer NaCl-Lösung; steril filtrieren;
		Aliquots à 1 ml bei -20°C maximal 1 Monat haltbar
hCG-Stock	500 U/Cap	5000 U Predalon (Organon #P 770-3, rezeptpflichtig)
		ad 1 ml mit isotonischer NaCl-Lösung; Aliquots à 100 µl
		lyophilisieren; Pulver bei -70°C ca. 1 Jahr haltbar
HeLa-D10-Medium		500 ml DMEM (Sigma #D-6046)
	10 %	55 ml HeLa-FCS (Biochrom #S-0115)
	1x	5 ml Pen/Strep, 100x (Sigma #P-0781)
		Zutaten unter einer Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C ca.
		4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
HeLa-Trypsin	0,04 %	20 mg Trypsin (Sigma #T-4799)
	0,5 mM	10 mg EDTA-Natriumsalz (Serva #11280)
		ad 50 ml mit Puck'scher Saline, pH 7,5; steril filtrieren;
		Langzeitlagerung bei -20°C; sonst bei 4°C
IM (Injektionsmedium)		5 ml TM (Transfermedium)
	200 U/ml	100 µl DNase, 10.000 U (Roche #776-785)
		steril filtrieren; Aliquots à 100 µl in Einfrierampullen bei -20°C
		ca. 6 Monate lagerbar
KCl-Lösung, isotonische	0,56 %	0,56 g Kaliumchlorid (Merck #1.04936)
		ad 100 ml mit ZK-Wasser; Lagerung bei 4°C

2. MATERIAL

KM (Kulturmedium)		40 ml DMEM (Gibco BRL #41965-039)
	10 %	4,4 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
	1 mM	440 µl Na-Pyruvat, 100 mM (Gibco BRL #11360-039)
	1x	440 µl Pen/Strep, 100x (Sigma #P-0781)
	2 mM	440 µl Glutamin, 200 mM (Sigma #G-7513)
		Drei Aliquots (für eine Woche BCI) à 1,9 ml bei 4°C eine Woche lagerbar; der Rest wird zur Herstellung von TM benötigt.
NaCl-Lösung, isotonische	0,9 %	4,5 g NaCl (Merck #1.0404) ad 500 ml; 1 h autoklavieren; bei 4°C lagern
Puck'sches Salin	137 mM	8 g NaCl (Merck #1.06404)
	5,4 mM	0,4 g KCl (Merck #1.04936)
	5,5 mM	1 g D(+)-Glukose (Merck #1.08337)
	4,2 mM	0,35 g NaHCO ₃ (Merck #1.06329) ad 1 l; steril filtrieren; bei -20°C lagern
Puromyzin-Stock	0,05 %	100 mg Puromyzin (Sigma # P-8833) lösen in 200 ml ZK-Wasser; steril filtrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
TM (Transfermedium)		40 ml KM (Kulturmedium)
	33 mM	1,32 ml HEPES, 1M (Gibco BRL #15630-056) Auf Aliquots aufgeteiltes Medium (für eine Woche BCI) bei -20°C lagerbar.
Xylazin-Ketamin (Narkotikum)		4,25 ml isotonische NaCl-Lösung
	0,2 %	0,5 ml Rompun, 2 % (Bayer AG #R1061)
	0,5 %	0,25 ml Ketavet, 100 mg/ml (Pharmacia & Upjohn #89984) Lösung mischen; Aliquots bei 4°C mind. 1 Woche haltbar; zur Narkose werden 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt

2.5 Lösungen für β -Galaktosidase- und andere Nachweise

Blockierungslösung (IF)	4 %	BSA
	2-5 %	Goat
		Ad 50 ml ddH ₂ O
Blockierungslösung (OLDENBURG-Puffer)	50 mM	Tris
	1,5 %	NaCl
	0,3 %	Triton X-100
		Ad 500 ml mit rauchender HCl auf pH 7,6 einstellen
		Blockierung: 5 % Goat und 5 % NGS (optional: 0,1 % Triton X-100)
DAB-Färbelösung	0,01 %	3 μ l H ₂ O ₂ , 30 % (Merck#1.08597)
		ad 10 ml mit Diaminobenzidin-Lösung; immer frisch ansetzen
Deoxycholat-Lösung	10 %	10 g Natriumdeoxycholat (ICN #102906)
		ad 100 ml
Diaminobenzidin-Lösung	0,06 %	1 Tablette Diaminobenzidin (Sigma #D-5905)
		ad 15 ml mit TBS, steril filtrieren; Lagerung bei -20°C
EGTA-Lösung	100 mM	7,6 g EGTA (Sigma #E-3889)
		Zugabe von 170 ml ddH ₂ O; Zugabe von 1-2 Tropfen 10 N NaOH bis Lösung klar wird; pH 8,0; ad 200 ml
Eosin-Färbelösung	0,1 %	0,5 g Eosin Y (Sigma #E-4382)
		ad 500 ml, filtriert mehrfach verwendbar
Fixierlösung (Bouin)		75 ml Pikrinsäure
		5 ml Eisessigsäure
		25 ml Formaldehyd (37 %)
Fixierlösung (z.B. Gewebe)	4 %	4 ml Formaldehyd (37 %) ad 100 ml PBS-
Fixierlösung (z.B. LacZ)	0,2 %	Glutaraldehyd, 30 % (Sigma #G-6257)
		ad 50 ml mit PBS; Lösung immer frisch ansetzen
Hämalaun-Färbelösung		
Hoechst-Lösung	0,05 %	25 mg Hoechst 33258 (Sigma #B-2883)
		ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagerbar

2. MATERIAL

K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung	0,5 M	8,23 g Kaliumhexacyanoferrat(III) (Merck #1.115305) ad 50 ml; dunkel bei 4°C lagern
K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung	0,5 M	10,56 g Kaliumhexacyanoferrat(II) (Merck #4982) ad 50 ml; dunkel bei 4°C lagern
Kryoschutz-Lösung	30 %	15 g Sucrose (Sigma #S-9378) ad 50 ml mit PBS-
LacZ-Basislösung	100 mM 1,25 mM 2 mM	170 ml Na ₂ HPO ₄ -Lösung, 0,5 M ~ 30 ml NaH ₂ PO ₄ -Lösung, 0,5 M 25 ml MgCl ₂ -Lösung, 50 mM 20 ml EGTA-Lösung, 100 mM nur Phosphatpuffer mit pH7,4; anschließend Zugabe der anderen Lösungen; schließlich ad 1 Liter
LacZ-Färbelösung	5 mM 5 mM 80 mg/ml	5 ml K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung, 0,5 M 5 ml K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung, 0,5 M 10 ml X-Gal-Lösung, 4 % ad 500 ml mit LacZ-Waschlösung; Lösung ohne X-Gal lagerbar bei RT; nach Zugabe dunkel bei 4°C lagern; Lösung steril filtriert mehrfach verwendbar
LacZ-Fixierlösung	0,2 %	400 µl Glutaraldehyd, 30 % (Sigma #G-6257) ad 50 ml mit LacZ-Basislösung; Lösung immer frisch ansetzen
LacZ-Waschlösung	0,01 % 0,2 %	1 ml Deoxycholat-Lösung, 10 % 2 ml Nonidet P40 (Roche #1754599) ad 1 l mit LacZ-Basislösung
MgCl ₂	50 mM	2,03 g Magnesiumchlorid (Merck #5833) ad 200 ml
Na ₂ HPO ₄ -Lösung	0,5 M	44,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck #1.06580) ad 500 ml (sollte pH ~ 9 sein)
NaH ₂ PO ₄	0,5 M	34,5 Natriumdihydrogenphosphat (Merck #6346) ad 500 ml (sollte pH ~ 4,7 sein)
Perfusions-Lösung		0,1 g Sodium Nitroprusside (Sigma #S-0501) ad 100 ml mit PBS-; Lösung immer frisch ansetzen

2. MATERIAL

PFA, 4 %	4 %	20 g Paraformaldehyd (Sigma #P-6148) Zugabe von 430 ml ddH ₂ O; erhitzen auf 60°C; Zugabe von 1-2 Tropfen NaOH bis die Lösung klar wird; nach Abkühlen Zugabe von 50 ml 10x PBS-, pH 7,2 einstellen; ad 500 ml ddH ₂ O; steril filtrieren; Aliquots bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar
PO-Lösung, endogene	45 ml PBS-	
	10 %	5 ml Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
	0,01 %	150 µl H ₂ O ₂ , 30 % (Merck #1.08597)
		Lösung immer frisch ansetzen
Propidiumjodid-Lösung	10 mg/ml	10 mg Propidium Iodide (Sigma #P-4170) ad 1 ml mit PBS-; Aliquots bei 4°C dunkel lagern
TPS-Puffer	10 mM	0,6 g Tris (ICN #819623)
	150 mM	4,38 g NaCl (Merck #1.06404) ad 500 ml; pH 7,5
X-Gal-Lösung	4 %	2 g X-Gal (Roth #2315.3) ad 50 ml mit N,N'-Dimethylformamid (Merck #1.03053); lichtgeschützt bei -20°C lagern

2.6 Lösungen für die Protein-Analytik

1x Laemmli-Probenpuffer	62,5 mM	0,757 g Tris (ICN #819623)
	3 %	30 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736) [oder 3 g SDS (Sigma #L-4509)]
	10 %	10 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)
	0,01 %	10 mg Bromphenolblau (Serva #15375)
	5 %	5 ml 2-Mercaptoethanol (Sigma #M-7154) ad 100 ml; pH 6,8; Lagerung bei RT ohne 2-Mercaptoethanol; nach Zugabe 3 Monate verwendbar
APS	10 %	1 g Ammoniumpersulfat (Sigma #A-3678) ad 10 ml; Lagerung bei 4°C max. 1 Monat

2. MATERIAL

Complete (25x)		1 Tablette Complete (Roche #1697498) ad 2 ml; bei -20°C lagern
Coomassie-Entfärber	10 %	50 ml Essigsäure (Merck #1.00062)
	30 %	150 ml Methanol (Riedel-de-Haën #32213) ad 500 ml
Coomassie-Färbelösung	0,25 %	1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (ICN #821616)
	10 %	50 ml Essigsäure (Merck #1.00062)
	50 %	250 ml Methanol (Riedel-de-Haën #32213) ad 500 ml; filtrieren durch Faltenfilter; bei RT lichtgeschützt lagern; Lösung kann mehrfach wiederverwendet werden
IF-Blockpuffer	4 %	1 g BSA, Fraktion V (PAA #K41-001-500)
	0,1 %	25 µl Triton X-100 (Serva #37240) ad 25 ml mit PBS-; Lösung immer frisch ansetzen
RIPA-Puffer	10 mM	1,5 ml Na ₂ HPO ₄ -Lösung, 0,5 M ~ 0,5 ml NaH ₂ PO ₄ -Lösung, 0,5 M
	0,1 %	1 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	40 mM	0,168 g Natriumfluorid (Merck #1.06450)
	2 mM	74,4 mg EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	1 ml Triton X-100 (Serva #37240) Phosphatpuffer pH 7,2; ad 100 ml; 1 h autoklavieren; immer frisch zugeben
	0,1 %	1 ml Deoxycholat-Lösung, 10 %
RIPA-Waschpuffer	10 mM	8 ml Na ₂ HPO ₄ -Lösung, 0,5 M ~ 2 ml NaH ₂ PO ₄ -Lösung, 0,5 M
	1 M	29,22 g NaCl (Merck #1.06404)
	40 mM	0,84 g Natriumfluorid (Merck #1.06450)
	10 mM	1,86 g EDTA (Sigma #E-5134)
	0,2 %	1 ml Triton X-100 (Serva #37240) Phosphatpuffer pH 7,2; ad 500 ml; mit 10 N NaOH auf pH 7,0; 1 h autoklavieren

2. MATERIAL

Sammelgelpuffer	0,5 M	30,25 g Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,4 %	20 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		ad 500 ml, (sollte pH 6,8 sein); steril filtrieren; bei 4°C lagern
SDS-running buffer	0,25 M	15 g Tris-Base (Sigma #T-1503)
	1,92 M	72 g Glycin (Merck #1.04201)
	1 %	50 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		ad 5 l; pH 8,3
Sepharose 4B-Gel		500 µl Sepharose 4B (Amersham #17-0120-01)
		Gel überschichten mit gleichem Volumen TBS-Puffer; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
Sepharose-ProteinA-Gel		150 mg ProteinA Sepharose CL-4B (Amersham #17-0780-01)
		ad 500 µl mit TBS-Puffer; 2 h bei 4°C auf dem Sonnenrad quellen lassen, nach Zentrifugation (5 min., 4.000 Upm, 4°C) Überstand abnehmen und mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
Transferpuffer, 1x		200 ml 5x Transferpuffer
	20 %	200 ml Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
		ad 1 l
Transferpuffer, 5x	50 mM	15,4 g Tris-HCl (Sigma #T-3253)
	0,1 M	18,5 g Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,8 M	144,2 g Glycin (Merck #1.04201)
		ad 2 l, (sollte pH 8,3 sein)
Trenngelpuffer	1,5 M	91 g Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,4 %	20 ml SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		ad 500 ml; (sollte pH 8,8 sein); steril filtrieren; bei 4°C lagern
Waschblotpuffer	8,5 mM	2,68 g Tris-HCl (Sigma #T-3253)
	1,7 mM	0,4 g Tris-Base (Sigma #T-1503)
	50 mM	5,8 g NaCl (Merck #1.06404)
	0,1 %	2 ml Tween 20 (Merck #8.22184)
		ad 2 l
Western-Blockpuffer	5 %	1 g Magermilchpulver (Sucofin)
		ad 20 ml mit Waschblotpuffer; Lösung immer frisch

2.7 Fertige Lösungen

Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese Gel 30 für Protein-SDS-Page-Gele (Roth #3029.1)

Benzyl Benzoate (Sigma #B-6630)

Benzylalkohol (Sigma #B1,620-8)

Chloroform (Merck #1.02445)

Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako #002627)

Demecolcine Solution (Colchizin) für ES-Zell-Karyotypanalyse (Sigma #D-1925)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck #1.02950)

ES-PBS⁻ (Dulbecco's Phosphate buffered saline) für ES-Zellkultur (Sigma #D-8537)

Eisessig (Merck #1.00063)

Entellan (Merck #1.07961)

Ethanol (Serva #11093)

Ethidiumbromid, 1 % (Merck #1.11608)

Formaldehyd, 37 % (Merck #1.04003)

Giemsa-Färbelösung (Sigma #GS-500)

Isopropanol (Merck #1.09634)

Methanol (Riedel-de-Haën #32213)

Mineral Oil als PCR-Öl (Sigma #M-5904)

QuickHyb (Stratagene #201220)

Roti-Block (10x) (Roth #A151.1)

Roti-Phenol/Chloroform (Roth #A156.2)

TEMED (Sigma #T-9281)

Tissue-Tec (Sakura #4583)

TRIzol (Gibco BRL #15596-018)

2.8 Reagenziensätze (Kits)

Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma #BCA-1)

ECL-Plus (Amersham #RPN 2132)

Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit (Genomed #210050)

M.O.M™ Immunodetection Kit, Peroxidase (Vector Laboratories #PK-2200)

Multiprime-DNA labelling system (Amersham #RPN 1601Z)

Perfectpret Gel Cleanup Kit (Eppendorf #0032007.759)

Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28706)

2.9 Allgemeine Labormaterialien

Sterile Zellkulturartikel wurden von den Firmen Falcon, Sarstedt, Nunc und Becton Dickinson bezogen.

Pipettenspitzen und Reagenzgefäße stammten von der Firma Sarstedt.

Agarose (Gibco BRL #155010-027)

Faltenfilter (Schleicher & Schuell)

Hybond-ECL Nitrozellulose Membran (Amersham #RPN2020D)

Hybond-N- sowie Hybond-N⁺-Membran (Amersham #RPN203N sowie #RPN203B)

Objektträger Superior (Marienfeld #1000200)

SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser #041300)

Röntgenfilme X-OMAT AR (Sigma #Z35,849-5); BIOMAX AR und BIOMAX MR (Kodak)

Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm (Schleicher & Schuell)

Whatman 3mm-Papier GB 002 (Schleicher & Schuell #426693)

2.10 Geräte

Axiophot; Mikroskop mit Epifluoreszenz und angeschlossener AxioCam color HR (Zeiss)

Binokular MS5 (Leica)

Blotting-Chamber Mighty-Small II [Western-Elektroblot] (Bio-Rad)

Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260 mit SE245 [SDS-PAGE] (Hoefer)

Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 [Nukleinsäuren] (Pharmacia)

Entwicklermaschine (AGFA Curix 60)

Handmonitor LB 1210 B (Berthold)

ImageMaster VDS [UV-Apparatur zur Dokumentation von EtBr-Agarosegelen] (Pharmacia Biotech)

Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO₂-Regelung (Heraeus)

Kryostat HM5000M (Microm)

Laser Scan Mikroskop (Zeiss)

Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020 und Paraffingießstation EG 1140H (Leica)

Paraffin-Schnitt-Transfersystem mit Rotationsmikrotom HM 360 (Leica)

PCR Maschine PTC-100 und PTC-200 Programmable Thermal Controller (BioZym)

Primus 96 plus Thermocycler (MWG Biotech AG)

Spektralfotometer DU 640 (Beckman)

Strudelmixer Reax 2000 (Heidolph)

Szintillationszähler LS 1801 (Beckman)

Ultraschallbad Transonic T460, ELMA und Ultraschallspitze Sonifer B-12 (Branson)

UV-Stratalinker 2400 (Stratagene)

Vibratom VT1000S (Leica)

Zentrifugen: Biofuge A (Heraeus); Kühlzentrifugen 2-MK und ZK15 (Sigma); Kühlzentrifuge Minifuge RF [15/50 ml Röhrchen] (Heraeus)

2.11 Plasmide

Die Vektorkarten der wichtigen Plasmide wurden im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

Bezeichnung [Größe in bp]	Beschreibung	Referenz/Firma
pBluescript II SK(+) (pBSK) [2961 bp]	Klonierungsvektor (ANHANG; Plasmidkarte 7)	Stratagene (#212205) SHORT et al., 1988
Cx26 8kb-Subklon [11465 bp]	8,0 kb EcoRI-Fragment isogener Cx26 DNS mit Cx26 kodierender Region in pBSK	Thomas OTT unveröffentlicht
Cx26 8kb-Subklon (5'-UTR) [11465 bp]	8,0 kb Cx26 Fragment mit Cx26 kodieren- der Region und neu amplifizierter 5'-HR (1,8 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I) in pBSK	diese Arbeit Silvia QUERINGS, Diplomarbeit (2003)
Cx26 8kb-Subklon (5'-UTRneu) [11465 bp]	8,0 kb Cx26 Fragment mit Cx26 kodierender Region, neuer 5'-HR (1,8 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I) und neuer 3'-HR (5.0 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Nsi</i> I) in pBSK (ANHANG; Plasmidkarte 1)	diese Arbeit Silvia QUERINGS, Diplomarbeit (2003)
pBS-Spacer- <i>Bam</i> HI/ <i>Nae</i> I [2967 bp]	zwei <i>Nsi</i> I-Restriktionsschnittstellen einge- fügt in pBSK (ANHANG; Plasmidkarte 6)	diese Arbeit
pBSK Cx26 <i>SMA</i> 2 [3506 bp]	Spleißakzeptorstelle von Cx26 in pBSK (ANHANG; Klonierungsstrategie)	diese Arbeit
SACx26Ki32CR <i>Sma</i> Bam	Kodierende Region von Cx32 in den Vektor pBSK Cx26 <i>SMA</i> 2	diese Arbeit
Cx26Ki32 <i>Sma</i> Bam delta <i>Sph</i> I [4388 bp]	Der Vektor SACx26Ki32CR <i>Sma</i> Bam ohne <i>Sph</i> I-Schnittstelle (ANHANG; Plasmidkarte 2)	diese Arbeit
Cx26KICx32 [11218 bp]	Cx32 kodierende Region mit SA26 klon- iert in den Vektor 'Cx26 8kb-Subklon 5'- UTRneu) (ANHANG; Plasmidkarte 3)	diese Arbeit

2. MATERIAL

pBS-frt-neo-frt- <i>Hind</i> I (product2) [4886 bp]	1,9 kb <i>Hind</i> I-Fragment bestehend aus frt-Erkennungsstellen und dem Neomycin-Resistenzgen in pBSK	Sonja HOMBACH Unveröffentlicht
frt-neo-frt 2x <i>Nsi</i> I [4522 bp]	frt-Erkennungsstellen und Neomycin-Resistenzgen im Vektor pBS-Spacer- <i>Bam</i> HI/ <i>Nae</i> I (ANHANG; Klonierungsstrategie)	diese Arbeit
Cx26KICx32neo (ANHANG; Plasmidkarte 4)	Cx26KICx32 mit Neomycin-Selektionskassette aus 'frt-neo-frt 2x <i>Nsi</i> I'	diese Arbeit
pSV-LacZ	Eukaryotischer Expressionsvektor, der die kodierende Region des lacZ-Gens enthält	Promega (#E1081)
NLS-LacZ <i>Sma</i> Nsi [6913 bp]	Das Reportergen wurde in den Vektor pBS-Spacer- <i>Bam</i> HI/ <i>Nae</i> I kloniert. (ANHANG; Klonierungsstrategie)	diese Arbeit
SACx26 NLS-LacZ <i>Sma</i> Nsi [6968 bp]	NLS-LacZ <i>Sma</i> Nsi mit Spleißzeptorstelle von Cx26 (ANHANG; Klonierungsstrategie)	diese Arbeit
loxP-...-loxP	Insert mit EcoRV ausgeschnitten; loxP-Stellen, die das Reportergen flankieren	
loxP-SACx26 NLS-LacZ-loxP [7398 bp] (ANHANG; Klonierungsstrategie)	NLS-LacZ <i>Sma</i> Nsi mit Spleißzeptorstelle von Cx26 zwischen den loxP-Erkennungsstellen	diese Arbeit
pCx26KILacZKICx32neo [17656 bp] (ANHANG; Plasmidkarte 5)	Austauschvektor für die ES-Kultur; kann mit <u>Not</u> I und XhoI linearisiert werden besteht aus: 1,9 kb 5'-HR; loxP-Sequenzen, die das LacZ-Reportergen flankieren, der Cx32 kodierenden Region, frt-Sequenzen, die die Neomycin-Selektionskassette flankieren, 5 kb 3'-HR	diese Arbeit

Cx26KI32 [11.657 bp]	PCR-Testvektor	1958 bp Cx26-5'-HR; 5.0 kb Cx26-3'-HR; 1.0 kb Cx32 kodierende Region	diese Arbeit
pdrp- <i>Sma</i> I [7000 bp]		4.0 kb <i>Sma</i> I-Fragment aus dem externen Cx26-5'-Bereich (aus Balb C genomische Bank)	Heinz-Dieter Gabriel unveröffentlicht
pCre-Pac [6000 bp]		eukaryotischer Expressionsvektor	TANIGUCHI et al., 1998
pBS-CMV-Intron-BS-NLS-lacZ- Vektor		Expressionsvektor für HeLa-Zellkultur	Maria Kreuzberg
Cx43 SacdHind		Cx43 externe Sonde	Gaby Schwarz unveröffentlicht

2.12 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
DNS 100 bp-Leiter (Gibco BRL #15628-019)	100, 200, 300, 400, 500, 600 , 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 2.072 bp
DNS 1 kb-Leiter (Gibco BRL #15615-024)	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1.018, 1.639 , 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216 bp
λ -DNS, <i>Hind</i> III (Roche #745782 gespalten mit <i>Hind</i> III)	Bei 200 ng Auftrag entspricht jede Bande einer Masse von (ng): 125 (0,5), 564 (2,3), 2.027 (8,4), 2.322 (9,58), 4.361 (18), 6.557 (27), 9.416 (38,8), 23.130 bp (95,37 ng)
RNS-Leiter (Gibco BRL #15620-016)	240, 1.350, 2.370, 4.400, 7.460, 9.490 bp
Protein-Leiter SeeBlue Plus2 (Invitrogen #LC5925)	4, 6, 16, 22 , 36, 50, 64, 98, 148, 250 kDa

2.13 Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue MRF	Genotyp: <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(\text{mcr})\text{A183}$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F'proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r 12,5 $\mu\text{g/ml}$)]</i> , Vermehrung von Plasmiden	BULLOCK et al., 1987
MM294-Cre (Cre- <i>E. coli</i>)	Genotyp: <i>F⁻</i> , λ^- , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lacZ</i> : <i>cl857-Cre</i> , Cre-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien; Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	BUCHHOLZ et al., 1996
MM294-Flp (Flp- <i>E. coli</i>)	Flp-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien; Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	BUCHHOLZ et al., 1996

2.14 Eukaryotische Zell-Linien

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
HeLa (ATCC CCL 2)	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe als untransfizierte Wildtyp-Zellen (HeLa-WT)	JONES et al., 1971
HM-1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	MAGIN et al., 1992

2.15 Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer)

Startermoleküle wurden bei MWG und EUROGENTEC bestellt, mit ddH₂O auf 100 pmol/ μl verdünnt, aliquotiert à 20-50 μl und bei -20°C gelagert (Verdünnung zu 10 pmol/ μl)

Startermoleküle zur Anreicherung von DNS-Fragmenten, die zur Klonierung benötigt wurden:

Cx26-Sma	5' GCC TAG AGG AGG CTG TGT GTG 3'
Cx26SMA2	5' CCC GGG CTC TGC ATG CTT GGC ACT GGA GAA GAC AAA C 3'
Cx26SA-NcoI	5' GGA GTG TGC CCC AAT CCA TGG TG 3'
Anreicherung der Cx26 Spleißakzeptorstelle (Cx26SMA2 für 'pBSK Cx26SMA2'; Cx26SA-NcoI für 'SACx26 NLS-LacZ <i>Sma/Nsi</i> '	

2. MATERIAL

Cx26-for	5' GGG CTA GTC TGT GGA TGC TAT AGG CAG G 3'
Cx26-UTR-Sma	5' TTC CTT TTT TGC GGC CGC TTA ACT GTC TTC CCG GGC AAA CAC C 3'
	Anreicherung von 1.9 kb 5'-homologer Region
Cx32-Sph	5' CCA <u>AGC ATG CAG</u> AGG ACA AGA TGA ACT GGA CAG GTC TAT ACA CC 3'
Cx32-NsiBam	5' GCG GAA TCC ATG CAT GGG GAA GGT TGC CTG GTA CTG G 3'
	Anreicherung der Cx32 kodierenden Region
Neo-for	5' CGC GGA TCC ATG CAT GCC GGC GAA CGT GGC GAG 3'
Neo-rev	5' TCC CCC GGG ATG CAT GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC G 3'
	Anreicherung eines 'Spacer'-Fragments aus pBluescript zum Einfügen zweier <i>/SmaI</i> -Schnittstellen; Klonierung der frt-neo-frt-Kassette und LacZ-Reportergen
Cx26-T-for	5' AAG GAA AAA AGC GGC CGC ATG TTG TGC TAA CTC C 3'
Cx26-Test-rev	5' GGA GGA TCC CTT TGC CTG CCT ATA G 3'
	Anreicherung eines 158 bp großen Cx26 Fragments in der 5'-HR vor <i>BamHI</i>
Startermoleküle zur Sequenzierung von Plasmiden (nur <u>nicht</u>-PCR Startermoleküle):	
T3 Promoter	5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'
T7 Promoter	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
LoxPLacZDSP1	5' GAG AGC CAC ACA CTT AAC CCT ATG 3'
LoxPCx32DSP	5' CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TG 3'
Cx32USP	5' CGG TAG AAT TGG CCG CGA AGT TCC 3'
Startermoleküle für RT-PCR Analysen (intron-überspannende):	
Cx26 USP	5' CGG AAG TTC ATG AAG GGA GAG AT 3' (DAVIES et al., 1996)
Cx26 DSP	5' GGT CTT TTG GAC TTT CCT GAG CA 3'
Cx32 USP	5' CTG CTC TAC CCC GGC TAT GC 3' (DAVIES et al., 1996)
Cx32 DSP	5' CAG GCT GAG CAT CGG TCG CTC TT 3'
Cx43 USP	5' TAC CAC GCC ACC ACC GGC CCA 3' (DAVIES et al., 1996)
Cx43 DSP	5' GGC ATT TTG GCT GTC GTC AGG GAA 3'
Neuer-LacZ USP	5' CGT TGC ACC ACA GAT GAA ACG CCG 3'
Neuer-LacZ DSP	5' GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC 3'

β-Aktin USP	5' CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G 3' (DE SOUSA et al., 1993)
β-Aktin DSP	5' TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G 3'
Startermoleküle zur Genotyp-Bestimmung von ES-Zellen und transgenen Mäusen:	
Cx26_for	5' GGG CTA GTC TGT GGA TGC TAT AGG CAG G 3'
Cx32_rev	5' CGC CAC TGA GCA AGG TGT ATA GAC C 3'
LacZrev_1	5' CCA TTC AGG CTG CGC AAC TGT TGG G 3'
(LacZrev_2	5' GGT GCC GGA AAC CAG GCA AAG CGC C 3')
Nachweis der homologen Rekombination des Austauschvektors 'Cx26KiLacZKiCx32neo' in ES-Zellen	
Cx26ss-for	5' AGC AGC CTA GAG GAG GCT GTG TGT GC 3'
Cx26ss-rev1	5' GGA CCC TTC GAT ACG GAC CTT CTG GG 3'
LacZrev1	5' CCA TTC AGG CTG CGC AAC TGT TGG G 3'
Cx32ss-rev	5' GCT CTC AGC AGC CAC CAC CAG CAC 3'
Unterscheidung der Allele Cx26 ^{WT} ; Cx26 ^{LacZ} und Cx26 ³² in der 5'-HR in transgenen Mäusen	
Cx32ss-for	5' CCA CCG CCT CTC ACC TGA ATA CAA GC 3'
Cx26ss-rev2	5' GGG TTG CCT CAT CCT CTC CCT CC 3'
Neo-for	5' CGC AGC GCA TCG CCT TCT TCG CC 3'
Unterscheidung der Allele Cx26 ³² und Cx26 ^{32neo} in der 3'-HR in transgenen Mäusen	
Cx43-RO4	5' CGC CTC ATT ACT GAG GTT GTT GAG 3'
Cx43-HO2	5' CGC AAT TAC AAC AAG CAA GCC AGC 3'
Ki26Cx26	5' GGT GGA CCT ACA CCA CCA GCA TC 3'
Ki26neo5	5' CTC TGA GCC CAG AAA GCG AAG GAG 3'
Unterscheidung der Allele Cx43 ^{WT} ; Cx43 ²⁶ und Cx43 ^{26neo} in transgenen Mäusen	
USP Flp	5' TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG 3'
DSP Flp	5' GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG 3'
IntCre_rev	5' TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG 3'
up-IntCre	5' TTT GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC 3'
Nachweis auf Anwesenheit der kodierenden Region der Flp- bzw. Cre-Rekombinase in transient transfizierten ES-Zellen sowie des Flp- bzw. spezifischen Cre-Transgens in transgenen Mäusen	

2.16 Hybridisierungssonden

Sonden	Vektorbezeichnung	Endonukleasen	Fragmentgröße [bp]
5'-Sonde (Cx26)	pdrp-Sma	<i>Xba</i> I-Fragment	1000 bp
Interne LacZ-Sonde	SACx26 NLS-LacZ <i>Sma</i> <i>Nsi</i>	<i>Cla</i> I/ <i>Nco</i> I-Fragment od. <i>Eco</i> RV/ <i>Nco</i> I-Fragment	868 bp 1155 bp
Externe Cx43 Sonde	Cx43 <i>Sac</i> dHind	<i>Ava</i> I-Fragment	550 bp
Interne Cx26 Sonde	PCR-Fragment	Cx26-Sma u. Cx26-rev	800 bp

2.17 Mauslinien

Stamm	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle und Referenz
C57Bl/6	Wildtyp-Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen; Weibchen als Blastozysten-Spendertiere für BCI	Charles River; eigene Zucht
NMRI	Wildtyp-Mausstamm, albino, Weibchen als Empfängertiere für BCI, vasktomierte Männchen zur Erzeugung von schein-schwangeren Leihmüttern (Foster)	Charles River; eigene Zucht
deleter-Flp	Transgene Mauslinie, welche die Flp-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promoters exprimiert	RODRÍGUEZ et al., 2000
PGK-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des PGK Promoters exprimiert	LALLEMAND et al., 1999

2.18 Antikörper

2.18.1 Primärantikörper

anti-Cx26	monoklonaler Antikörper, Maus [IF 1:1000; WB 1:500] (Zymed 13-8100)
-----------	--

anti-Cx26	polyklonaler Antikörper, Kaninchen [IF 1:500] (Zymed 51-2800)
-----------	--

anti-Cx43	polyklonaler α -Cx43-Antikörper, Kaninchen [IF 1:1000; WB 1:2000] (Christian SCHLIEKER)
-----------	---

anti-actin	monoklonaler α -anti-actin Antikörper [WB 1:500]
------------	---

anti-LacZ	monoklonaler Antikörper, Maus [IF 1:2000]
-----------	---

2.18.2 Sekundärantikörper

Alexa 594 (rot)	IgG, gegen Kaninchen, aus Ziege [IF 1:2000] (MoBiTec A-11037)
--------------------	--

Alexa 488 (grün)	IgG, gegen Kaninchen, aus Ziege (IF 1:2000) (MoBiTec A-11029)
---------------------	--

alk. Peroxidase	IgG, gegen Maus, aus Ziege [WB 1:10000-20000] In Glycerol gelöst, deshalb doppelt so viel einsetzen
-----------------	--

alk. Peroxidase	IgG, gegen Kaninchen, aus Ziege [WB 1:10000]
-----------------	--

3 METHODEN

3.1 *Nukleinsäure Analytik*

Die grundlegenden molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach den gängigen Laborhandbüchern (SAMBROOK und RUSSELL, 2001; AUSUBEL et al., 1989-2001), soweit nicht anders erwähnt, durchgeführt. Enzyme und Reagenziensätze wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

3.1.1 **Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren**

Ebenso groß wie die Vielfalt der Nukleinsäuren sind auch deren Isolierungsmethoden aus den verschiedenen Organismen. Hochmolekulare, genomische DNS wird anders isoliert und behandelt als kleine, einzelsträngige RNS-Moleküle oder zirkuläre Plasmide. Genauso spielt der Ausgangsorganismus eine große Rolle.

Mini und Midi Plasmid-DNS Präparationen werden aus Bakterien nach dem Protokoll der alkalischen Plasmid Isolierung präpariert (BIRNBOIM und DOLY, 1979) und die Endotoxin-freie Plasmid Maxi Präparation nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) durchgeführt. In Ausnahmen konnte die DNS erst über den alkalischen Weg isoliert und anschließend für die Endotoxin-freie Behandlung (QIAGEN) verwendet werden. Die Isolierung genomischer DNS wurde je nach Ausgangsquelle – Gewebe oder Kulturzellen - durchgeführt. Hierzu werden die Zellwände entweder mit ES-Lysis-Puffer (embryonale Stammzellen; Leberpräparate) oder Laird-Puffer (Schwanzspitzen; LAIRD et al., 1991) aufgeschlossen und die Zellproteine durch Inkubation mit Proteinase K proteolytisch abgebaut.

Die Reinigung und Präzipitation der DNS erfolgt je nach Verwendungszweck und vorliegender Verunreinigung. Proteinhaltige Verunreinigungen werden durch Ausschütteln der Nukleinsäurelösung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol beseitigt.

Zur Isolierung von RNS werden nur hochreine Puffer verwendet. RNasen sind äußerst stabil, benötigen keinerlei Kofaktoren für ihre Aktivität und können durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden. Vorhandene RNasen können durch Behandlung der Lösungen mit Dimethyl-Pyrocarbonate (DMPC) inaktiviert werden. Die Isolierung von Gesamt-RNS (rRNS, tRNS, hnRNS und mRNS) aus Geweben und Kulturzellen mittels TRIzol®Reagent beruht auf der Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987).

DNS oder RNS wird durch Ethanolzugabe gefällt. Die Präzipitation mit Ethanol ist die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung und weiteren Reinigung von Nukleinsäuren. In Gegenwart von monovalenter Kationen (Natriumacetat oder Ammoniumacetat) bildet die DNS oder RNS in Ethanol einen unlöslichen

Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. In vielen Fällen erfolgt die Fällung der Nukleinsäurelösung durch Zugabe von 0,5 bis 1 Volumenanteil Isopropanol.

Die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäurelösungen wird fotometrisch (Beckman DU®640) gemessen, basierend auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Abschätzung geringerer Mengen DNS wird im Gel durch Färbung mit Ethidiumbromid und anschließendem Vergleich mit einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentration (200 ng λ -DNS, *Hind*III, siehe 2.13) durchgeführt.

3.1.2 Aufarbeitung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, die aus den verschiedenen Organismen isoliert werden, liegen fast immer als kompakte oder hochmolekulare Strukturen vor. Unter dem Begriff Aufarbeitung werden alle grundlegenden Analyseverfahren für Nukleinsäuren zusammengefasst. Die folgenden Methoden kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

Spaltungssanalysen dienen sowohl zur Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNS-Fragmente als auch zur Identifizierung der entstehenden Klonierungsprodukte. Es wurden vollständige Spaltungen, Partialsplittings und Mehrfachspaltungen je nach Verwendungszweck durchgeführt. Die Analyse der Spaltungsansätze erfolgte über Gelelektrophorese, wobei das Trägermaterial hauptsächlich von Art und Größe der zu analysierenden Nukleinsäure bestimmt wird. Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nukleinsäuren. Eine exakte, reproduzierbare Analyse von RNS ist im Gegensatz zur DNS nur in denaturierenden Gelen möglich. Die Darstellung der Nukleinsäuren wird durch die Interaktion von Ethidiumbromid gewährleistet. DNS-Fragmente werden durch die Anwendung der Reagenziensätzen Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder Perfectprep Gel Cleanup Kit (EPPENDORF), nach Herstellerangaben, aus Agarose-Gelen isoliert.

Zusätzliche Methoden, die in der Arbeit und insbesondere bei der Klonierung von Vektoren angewendet wurden, waren PCR-Reaktionen (siehe 3.1.3), Modifikationen – Auffüll-Reaktionen mit Hilfe des Klenow-Fragments bzw. T4-DNS-Polymerase und Dephosphorylierungen mittels SAP (shrimp alkaline phosphatase) - ebenso wie Ligation der DNS-Fragmente.

Notwendige Sequenzierungen von Vektoren und Klonierungsschritten werden als Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA durchgeführt, indem die DNS in ddH₂O versandt wird.

Weitere Untersuchungen von Nukleinsäuren werden durch den Transfer auf eine feste Membran durchgeführt (Blotting-Verfahren). Im Fall der angewendeten Southern-Blotting Technik wird genomische DNS (20 μ g) nach Spaltung mit Restriktionsenzymen auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Transfereffizienz

der DNS wird durch eine partielle Depurinierung der DNS stark erhöht. Außerdem wird die DNS denaturiert, um für die Hybridisierung einzelsträngig zur Verfügung zu stehen. Die DNS wird mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) transferiert und fixiert (UV Stratalinker 2400). In Anlehnung an den Transfer von DNS auf Membranen wird der Transfer von RNS (20 µg) als Northern-Blotting bezeichnet. Eine Denaturierung der RNS ist, aufgrund der Auftrennung in denaturierenden Gelen, nicht notwendig. Analog zur DNS erfolgt der Transfer, über einen Kapillarblot, auf eine Nylonmembran (Hybond-N), und die Fixierung.

Der Nachweis der Nukleinsäure-Zielmoleküle, also der zu analysierenden DNS oder RNS, erfolgt über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären, markierten Nukleinsäure-Sonden (Hybridisierung). Die verwendeten DNS-Sonden wurden mit dem Reagenziensatz Multiprime-DNS labelling system (AMERSHAM), nach Herstellerangaben, radioaktiv markiert. Die Hybridisierungen werden mit den jeweiligen Hybridisierungspuffern – Formamid-haltig (RNS); QuickHyb® (DNS; STRATAGENE) durchgeführt. Der Nachweis erfolgt durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR). Die Expositionszeit ist abhängig von der Signalstärke und kann von 30 min. (bei RT) bis zu mehrere Tage (bei -70°C) bei Northern-Blotting Membranen variieren. Die Entwicklung des Films wird in einer Entwicklertaschine durchgeführt (Agfa Curix 60).

3.1.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (MULLIS und FALOONA, 1987) ist ein *in vitro*-Verfahren zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung von DNS-Fragmenten.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Anwendung der PCR-Reaktion in unterschiedlichen Bereichen, wie z.B. Klonierung, *in vitro* Mutagenese, Genotypisierung (insbesondere Multiplex-PCR) ebenso wie RT-PCR.

Beispiel für einen PCR-Ansatz und –Programm:

PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)	PCR-Programm			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
16,5 µl steriles ddH ₂ O	1	94°C	5 min.	1
2,5 µl 10x PCR-Puffer	2	94°C	45 sec.	
1,5 µl MgCl ₂ (25 mM)	3	60-90°C	1 min.	25-40
1,0 µl Startermolekül I (10 pmol/µl)	4	72°C	2 min.	
1,0 µl Startermolekül II (10 pmol/µl)	5	72°C	10 min.	1
1,0 µl dNTP (2.5 mM)	6	8°C	∞	1
0,5 µl Taq-Polymerase				

Unterschiedliche DNS-Konzentration; Taq-Polymerase-Konzentration (5 U/µl; PROMEGA)

Die Analyse und ggf. Aufreinigung (siehe 3.1.2) der amplifizierten DNS Sequenzbereiche erfolgt über eine Agarose-Gelelektrophorese. Als Kontrolle wird ein Ansatz mitgeführt, wo statt DNS Wasser eingesetzt wurde (H₂O-Kontrolle).

3.1.3.1 Genotypisierung von ES-Zellen und transgenen Mäusen

Nachfolgend sind die PCR-Ansätze aufgeführt, die in dieser Arbeit für (ES-Zell- bzw. Maus-) Genotypisierungen hauptsächlich verwendet wurden. Soweit nicht anders angegeben, wurden 25 mM MgCl₂, Taq-Polymerase (5 U/µl; PROMEGA) und 10 mM dNTP-Mix (2.5 mM each) verwendet. Die Startermoleküle wurden, nach Herstellerangaben, in einer Konzentration von 100 pmol/µl Stammlösung gelagert und mit einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

PCR zum Nachweis der homologen Rekombination von ‚Cx26KiLacZKiCx32neo‘ in ES-Zellen:
PCR-Ansatz (12,5 µl DNS + 12,5 µl Mastermix)

6,25 µl	dH ₂ O
1,25 µl	10x PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂
1,0 µl	Cx26for
1,0 µl	LacZrev1 oder Cx26rev
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (26Ki32)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	96°C	15 min.	1
2*	80°C	15 min.	1
3	94°C	3 min.	1
4	94°C	45 sec.	
5	68°C	1 min.	35
6	72°C	2 min.	
7	72°C	7 min.	1
8	4°C	∞	1

Die PCR wird als „hot-start“-PCR durchgeführt. 12,5 µl Proteinase K enthaltendes DNS-Lysat wird mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, zunächst 15 min. Hitze-behandelt, bevor der Mastermix bei 80°C zugegeben (markiert mit *) und die PCR fortgesetzt wird.

Ein Amplikon von 2,3 kb (Cx26for und LacZrev1) zeigt die homologe Rekombination des Vektors ‚Cx26KiLacZKiCx32neo‘ in HM-1 ES- Klonen an. Für das Cx26^{wt}-Allel wird ein 2,9 kb großes Fragment (Cx26for und Cx26rev) amplifiziert.

PCR zum Nachweis der Genotypen transgener Cx26 Mäuse in der 5´-HR (Cx26KiLacZKiCx32neo):
PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)

12 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂
2,0 µl	Cx26ss-for
1,0 µl	Cx26ss-rev1
1,0 µl	LacZrev1
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (NP-KI)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min.	1
2	94°C	30 sec.	
3	68°C	45 sec.	40
4	72°C	90 sec.	
5	72°C	10 min.	1
6	8°C	∞	1

Die PCR erfolgt in der 5´-Homologieregion (HR) zum Nachweis des Cx26^{LacZ}-Allels (402 bp) und des Cx26^{wt}-Allels (541 bp).

PCR zum Nachweis der Cre-vermittelten Deletion des LacZ-Reportergens (Cx26KiCx32neo und Cx26KiCx32) in der 5'-HR im heterozygoten/homozygoten Zustand:

PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)

12 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂
2,0 µl	Cx26ss-for
1,0 µl	Cx26ss-rev1
1,0 µl	Cx32ss-rev
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (NP-KI)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min.	1
2	94°C	30 sec.	
3	68°C	45 sec.	40
4	72°C	90 sec.	
5	72°C	10 min.	1
6	8°C	∞	1

Die PCR erfolgt in der 5'-Homologieregion (HR) zum Nachweis des Cx26³²-Allels (324 bp) nach Cre-vermittelter Deletion des LacZ-Reportergens und des Cx26^{wt}-Allels (541 bp).

PCR zum Nachweis der Fip-vermittelten Deletion der Neomycin-Selektionskassette (Cx26KiLacZKiCx32 und Cx26KiCx32) in der 3'-HR im heterozygoten/homozygoten Zustand:

PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)

12 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,5 µl	MgCl ₂
2,0 µl	Cx26ss-rev2
1,0 µl	Cx32ss-for
1,0 µl	Neo-for
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (NP-KI)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min.	1
2	94°C	30 sec.	
3	68°C	45 sec.	40
4	72°C	90 sec.	
5	72°C	10 min.	1
6	8°C	∞	1

Die PCR erfolgt in der 3'-Homologieregion (HR) zum Nachweis der Ab- bzw. Anwesenheit der Neomycin-Selektionskassette: Cx26^{lacZn}-Allels (631 bp) und Cx26^{lacZ}- bzw. Cx26³²-Allels (304 bp) nach Fip-vermittelter Deletion.

PCR zum Nachweis der Genotypen transgener Cx43 Mäuse (Cx43KICx26neo)

PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)

14,75 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,75 µl	MgCl ₂
1,0 µl	Cx43-HO2
2,0 µl	Cx43-RO4
1,0 µl	Ki26neo5
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (KAMA-KI):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min.	1
2	94°C	30 sec.	
3	62°C	45 sec.	40
4	72°C	90 sec.	
5	72°C	10 min.	1
6	8°C	∞	1

Die PCR erfolgt in der 3'-Homologieregion (HR) zum Nachweis des Cx43²⁶-Allels mit Neomycinselektionskassette (529 bp) und des Cx43^{wt}-Allels (381 bp).

PCR zum Nachweis der Flp-vermittelten Deletion der Neomycin-Selektionskassette (Cx43Ki26) im heterozygoten/homozygoten Zustand:

PCR-Ansatz (1 µl DNS + 24 µl Mastermix)

14,75 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1,75 µl	MgCl ₂
1,0 µl	Cx43-HO2
2,0 µl	Cx43-RO4
1,0 µl	Ki26Cx26
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (KAMA-KI):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min.	1
2	94°C	30 sec.	
3	62°C	45 sec.	40
4	72°C	90 sec.	
5	72°C	10 min.	1
6	8°C	∞	1

Die PCR erfolgt in der 3'-Homologieregion (HR) zum Nachweis des Cx43²⁶-Allels (529 bp) und des Cx43^{wt.}-Allels (381 bp).

PCR zum Nachweis der (spezifischen) Cre-Rekombinase in transgenen Mäusen:

PCR-Ansatz (24 µl Mastermix + 1 µl DNS):

18,4 µl	H ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
2,0 µl	MgCl ₂
0,2 µl	dNTP-Mix (40 mM)
0,2 µl	IntCre_rev
0,2 µl	up-*
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (CRE-JD):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	
3	60°C	1 min	40
4	72°C	2 min	
5	72°C	10 min	1
6	25°C	∞	1

Ein vorhandenes Amplikon zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der (spezifischen) Cre-Rekombinase im Genom der transient transfizierten HM1 ES-Zellen oder der untersuchten Mäuse an.

- * Int-Cre → Amplikon von etwa 420 bp spezifisch für alle Cre Transgene (Interne Cre-PCR)
- pgk1 → Amplikon von etwa 500 bp spezifisch für das PGK-Cre Transgen

PCR zum Nachweis der Flp-Rekombinase in transgenen Mäusen:

PCR-Ansatz (24 µl Mastermix + 1 µl DNS):

18,4 µl	H ₂ O
2,5 µl	10x PCR-Puffer
2,0 µl	MgCl ₂
0,2 µl	dNTP (40 mM)
0,2 µl	USP Flp
0,2 µl	DSP Flp
0,5 µl	Taq-Polymerase

PCR-Programm (CRE-JD):

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	96°C	5 min	1
2	95°C	30 sec	
3	68°C	50 sec	35
4	72°C	90 sec	
5	72°C	10 min	1
6	25°C	∞	1

Ein Amplikon von etwa 1,2 kb zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der Flp-Rekombinase im Genom der untersuchten Mäuse an.

3.1.3.2 Zusätzliche PCRs (RT-PCR)

PCR zur Amplifikation umgeschriebener RNS (RT-PCR):

PCR-Ansatz (50 µl)

33 µl	dH ₂ O
5,0 µl	10x PCR-Puffer
4,0 µl	MgCl ₂
2,0 µl	Startermolekül I
2,0 µl	Startermolekül II
2,0 µl	dNTP (40 mM)
1,0 µl	Taq-Polymerase
1,0 µl	cDNS

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	3 min.	1
2	94°C	1 min.	
3	65°C → 55°C	1 min.	10
4	72°C	2 min.	
5	94°C	1 min.	
6	55°C	1 min.	25
7	72°C	2 min.	
8	72°C	7 min.	1

Die RT-PCR wird mit den jeweiligen intron-überspannenden Startermolekülen für Cx26, Cx32, Cx43 und LacZ (siehe 2.16) durchgeführt.

PCR zur Amplifikation von Aktin:

PCR-Ansatz (50 µl)

28 µl	dH ₂ O
5,0 µl	10x PCR-Puffer
3,0 µl	MgCl ₂
5,0 µl	Aktin USP
5,0 µl	Aktin DSP
2,0 µl	dNTP (40 mM)
1,0 µl	Taq-Polymerase
1,0 µl	cDNS

PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	3 min.	1
2	94°C	1 min.	
3	65°C → 55°C	1 min.	10
4	72°C	2 min.	
5	94°C	1 min.	
6	55°C	1 min.	25
7	72°C	2 min.	
8	72°C	7 min.	1

Zur Überprüfung der Effizienz der Reversen Transkription und zum besseren Vergleich der einzelnen PCR-Reaktionen wird eine PCR zur Amplifikation von β -Aktin durchgeführt. Zusätzlich kann überprüft werden, ob sich Kontaminationen genomischer DNS im Ansatz befinden, da beide β -Aktin-Startermoleküle einen Bereich flankieren, der ein 87 bp großes Intron enthält (DE SOUSA et al., 1993).

3.1.4 Umschreiben von RNS in komplementäre DNS (cDNS)

3.1.4.1 RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)

Mit der Technik der RT-PCR ist es möglich, geringe Transkriptmengen in Geweben und Kulturzellen nachzuweisen. Für die Amplifikation ist es notwendig, die RNS zunächst in DNS umzuschreiben, da die Ausgangs-RNS nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Hierfür bieten sich mehrere Enzyme an, die als Reverse Transkriptasen (RTase) oder RNA-abhängige DNS-Polymerasen

bezeichnet werden. Man nennt den dabei gebildeten DNS-Strang auch komplementäre DNS (cDNS), und der Schritt, in dem diese cDNS entsteht, wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Die Gesamtreaktion aus RT und Amplifikation wird als RT-PCR beschrieben.

3.2 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Einführung von freier DNS in eine entsprechend vorbehandelte Bakterienzelle. Dieser Vorgang wird im Labor mit Hilfe speziell hergestellter kompetenter Bakterien durchgeführt, deren Zellwand durch Schwermetalle porös gemacht worden ist, wodurch sie leichter freie DNS aufnehmen können.

Im Allgemeinen werden transformationskompetente Bakterien (XL1-Blue; DH5α) mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode (HANAHAN, 1983) hergestellt, die eine durchschnittliche Transformationseffizienz von 10^6 - 10^7 pfu/μg aufweisen. Die kompetenten Bakterien werden bei -20°C gelagert. In besonderen Fällen wird mit hocheffizienten transformationskompetenten Bakterien gearbeitet. Das Protokoll von HANAHAN (1983) wird in leicht abgewandelter Form angewendet. Den Suspensionen wird zusätzlich DnD zugesetzt und die Transformation mit frischen Zellen durchgeführt (10^8 cfu/μg).

Zur Transformation werden die kompetenten Bakterien mit der zu transformierenden DNS gemischt und auf Eis gestellt. Nach anschließendem Hitzeschock und Inkubation in LB-Medium werden die Bakterien auf selektivem Medium ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Eine Besonderheit stellen die *E. coli* Bakterien MM294-Flp und MM294-Cre dar. Sie haben die orts-spezifische Rekombinase Flp bzw. Cre stabil in das Bakteriengenom integriert (BUCHHOLZ et al., 1996). Dies ermöglicht einen Funktionalitätsnachweis von inserierten *frt*- bzw. *loxP*-Sequenzen durch die Deletion des flankierten DNS-Abschnitts. Die Transformation erfolgt wie oben beschrieben jedoch wird die Flüssigbakterienkultur für die analytische Mini Plasmid Präparation bei 30°C anstatt 37°C, aufgrund einer erhöhten DNase-Aktivität, inkubiert.

Eine längerfristige Lagerung (-70°C) von Bakterien kann in Form von Glycerinkulturen erfolgen, die zur Rekultivierung verwendet werden.

3.3 Isolierung und Nachweis von Proteinen

3.3.1 Proteinpräparation

Alle Arbeiten mit Proteinen werden auf Eis oder 4°C durchgeführt, um die Proteindegradation möglichst zu unterbinden.

3.3.1.1 Herstellung von Zell-Lysaten (HeLa-Zellen)

Der Zellrasen einer 80-90 %-ig konfluenten Kulturschale wird mit PBS- gewaschen, kurz auf Eis inkubiert und abermals mit PBS- gewaschen. Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes werden 200 µl 2x Laemmli-Probenpuffer, ohne β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau, auf die Zellen gegeben und diese vom Untergrund gelöst. Optional können die Zellen auch in RIPA-Puffer oder „1x Complete“, einem Protease-Inhibitor Gemisch, aufgenommen werden. Das viskose Zell-Lysat wird mit einer Pipettenspitze vollständig in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt und kann bei -20°C mehrere Monate gelagert werden. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE werden dem Proteinlysate β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau zugesetzt. Alternativ können auch konfluent bewachsene Kulturschalen (nach 2x waschen) nach der vollständigen Entfernung des Überstandes bei -70°C aufbewahrt werden. Die Zell-Lyse erfolgt anschließend wie oben beschrieben.

3.3.1.2 Präparation von Proteinen aus Geweben

Die präparierten (siehe 3.7) und tiefgefrorenen Organe werden mit Hilfe von in flüssigem Stickstoff, vorgekühlten Schraubzylindern, Stößeln und eines Hammers zu Pulver zerkleinert und je nach Gewebegröße 6-12 Stunden lyophilisiert. Die so gewonnenen Gewebe-Lyophilisate werden in 1x Complete (siehe 3.3.1.1.) aufgenommen und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.3.2.2) in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

3.3.2 Protein-Analysen

3.3.2.1 Proteinnachweis durch Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie-Färbetechnik handelt es sich um eine schnelle Methode zum Nachweis von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel (Nachweis-Grenze: 0,3-1 µg/Proteinbande). Die Färbung beruht auf nicht-spezifischen Bindungen zwischen Proteinen und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R. Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine werden durch eine Lösung aus Methanol und Essigsäure fixiert. Ihr Nachweis innerhalb des Gels wird durch das in der Färbelösung enthaltene Coomassie Brilliant Blue R erzielt, wobei sich das gesamte Gel nach einer ca. 5-minütigen Inkubation blau anfärbt. Die Entfärbung erfolgt durch die

Zugabe einer Methanol- und Essigsäure-haltigen Entfärbelösung für mehrere Stunden oder üN, wobei sie mehrmals ausgetauscht werden sollte. Abschließend kann das Gel in Essigsäure oder Wasser, sowie in Folie eingeschweißt oder in getrockneter Form (Geltrockner: 2 Stunden bei 80°C) aufbewahrt werden.

3.3.2.2 Quantitativer Proteinnachweis in Lösungen mittels der Bicinchoninsäure-Methode (BCA)

Die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode stellt eine Kombination aus dem Biuret Verfahren und der Verwendung der Bicinchoninsäure (BCA) dar und wurde von SMITH et al. (1985) entwickelt. Die BCA-Methode zeichnet sich durch eine geringe Störanfälligkeit, einfache Durchführung aus und beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen, welche mit Na-Bicinchoninat unter alkalischen Bedingungen während einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C einen alkalischen Komplex bilden. Die Absorption kann bei 562 nm (Absorptionsmaximum des Komplexes) fotometrisch ermittelt werden, wobei die Nachweisgrenze der Proteine bei ca. 0,5 µg/ml liegt. Mit Hilfe einer BSA-Standardreihe und der ermittelten Absorption der Proben werden Rückschlüsse auf die vorliegende Proteinkonzentration gezogen. Die Anwesenheit von Detergenzien (z.B. SDS, Triton X-100) wirkt sich störend auf die fotometrische Vermessung aus, wohingegen Ammoniumionen, EDTA, DTT, Glutathion oder Ascorbinsäure toleriert werden. Für die Konzentrationsbestimmung wurde der Reagensatz „Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination“ entsprechend der Herstellerangaben benutzt.

3.3.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die von LAEMMLI (1970) entwickelte Methode der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese beruht auf einem diskontinuierlichen Gelsystem unter denaturierenden Bedingungen: auf ein niedervernetztes Sammelgel folgt ein hochvernetztes Trenngel. Das Prinzip der denaturierenden SDS-PAGE beruht darauf, dass SDS (Natrium-Dodecylsulfat) aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an Proteine proportional zu ihrer Größe zu binden vermag (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren). Dadurch werden die Proteine einerseits denaturiert, andererseits erhalten sie eine negative Ladung, proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Eigenladung tritt demgegenüber in den Hintergrund. Die Auftrennung der Proteine geschieht hauptsächlich durch die Siebeffekte des Gels. Dabei verhält sich die Wanderungstrecke der Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Für die Herstellung eines Polyacrylamid-Gels sind wässrige Lösungen wie Acrylamid (AA) und N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) notwendig, welche durch Zugabe eines Radikalstarters (APS; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) und eines Katalysators (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin = TEMED) zur Durchführung einer radikalischen Kopolymerisation befähigt sind. Auf diese Weise entsteht also ein mechanisch stabiles, dreidimensionales Netzwerk, wobei BIS die

Aufgabe der Quervernetzung übernimmt. Das Gesamt-AA:BIS-Verhältnis indes bleibt stets konstant: 30:1 oder 40:1. In der Praxis sind Gele zwischen 5-20 % üblich, wobei das Maß an Elastizität von 5 % aufwärts ansteigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 12,5 %-ige SDS-PAGE-Gele verwendet:

Zusammensetzung (für zwei Gele à 1,5 mm)	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)
AA-Stammlösung	2 ml	12 ml
4x Sammelgel-Puffer	3,8 ml	-
4x Trenngel-Puffer	-	7,5 ml
ddH ₂ O	9 ml	10,5 ml
TEMED	20 µl	18 µl
APS	90 µl	180 µl

Im Fall eines anschließenden Blotting-Verfahrens (Western Blotting) muss der Trenngelansatz vor der Zugabe von APS und TEMED im Exsikkator 15 min. entgast werden. Es wird eine SDS-Gelapparatur von HOEFER verwendet, wobei jeweils eine Glasscheibe und eine Öhrchenplatte durch zwei Abstandshalter voneinander getrennt, in die Gelgießvorrichtung eingespannt werden. Nach Anpassung des Geltaschen-Kamms werden die Taschen auf der Glasscheibe zur Erleichterung der Probenauftragung gekennzeichnet und 1 cm unterhalb des Taschenkamms eine weitere Markierung, die die Höhe des Trenngel-Bereiches angibt, angebracht. Es folgt die Ansetzung der obigen Trenngelsuspension, welche nach der Zugabe von APS und TEMED kurz umgeschwenkt und dann zügig mittels einer Spritze überführt werden sollte. Eine anschließende Übersichtung wird mit einigen Millilitern einer 0,1 %-igen SDS-Lösung, zur Erzeugung einer geraden Abschlusskante, durchgeführt. Nach der Polymerisation des Trenngels wird die überschichtete SDS-Lösung entfernt, der GeltaschenKamm positioniert und die Sammelgelsuspension mittels einer Spritze bis zum obersten Rand der beiden Scheiben injiziert. Nach der vollständigen radikalischen Polymerisation erfolgt die Überführung der Scheiben nebst Gel in die Elektrophorese-Apparatur und die Übersichtung mit Elektrophorese-Puffer.

3.3.2.4 Immunoblot-Analysen

Der Immunoblot (Western Blot, WBL) stellt eine sensitive Methode zum Nachweis und zur Charakterisierung von Proteinen dar, die durch polyklonale Antikörper oder einen monoklonalen Antikörper erkannt werden können. Proteinproben werden solubilisiert, einer SDS-PAGE unterworfen und können mittels unterschiedlicher Methoden (Elektrotransfer, Transfer nach dem Semi-Dry-Verfahren etc.) auf eine Trägermembran übertragen werden. Die Protein-Transfer-Effizienz kann durch reversible Anfärbungen, z.B. mit

Ponceau S ermittelt werden. Die Membran wird nach dem Transfer mit dem primären Antikörper inkubiert, auf welche, nach drei Waschschritten, die Inkubation mit einem, gegen den F_C-Teil des ersten Antikörpers gerichteten, sekundären Antikörper erfolgt. Der sekundäre Antikörper kann mit einem Enzym, wie z.B. der Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt sein, welches einen Epitop-Nachweis unter nicht radioaktiven Bedingungen zulässt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methode des ECL-Nachweises (ECL+Plus) beruht auf Chemilumineszenz und wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Expositionsdauer des Röntgenfilms (X-OMAT™) kann den Chemilumineszenz-Emissionen angepasst von 10 sec. bis 30 min. andauern.

3.4 Zellkultur

3.4.1 HM-1 embryonale Stammzellen (ES) der Maus

HM-1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus agouti-farbenen, männlichen Blastozysten des Mausstamms Sv129P2/OlaHsd isoliert (MAGIN et al., 1992). Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF. Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen erfolgt in Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Angaben über Kultur, Transfektion und Analyseverfahren finden sich auch in THEIS et al., 2000.

3.4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HM-1 Zellen werden in ES-WT-Medium kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90-100 % trypsinisiert und mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3 ausplattiert.

Die in ES-WT-Medium resuspendierten Zellen werden mit ES-Einfriermedium versetzt, in einem Einfrierbehälter bei -70°C durch Isopropanol eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der ES-Zellen sollte möglichst langsam durch kurzes Schwenken in einem 37°C Wasserbad erfolgen.

3.4.1.2 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

Transfektion ist die generelle Bezeichnung für Verfahren zur Einschleusung von DNS in höhere Zellen. Von einer stabilen Transfektion spricht man, wenn die eingeschleuste DNS in das Genom der Ausgangszellen stabil integriert wurden. Die stabile Transfektion von HM-1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation. Der Austauschvektor (200–350 µg) wird über die Reagenzien des Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kits aufgereinigt, mit *NotI* linearisiert und in TE-Puffer resuspendiert. ES-Zellen werden unter Standardbedingungen und bis zur Konfluenz (T75) kultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl werden 3x 10⁷

Zellen in HBS-Puffer aufgenommen und mit dem linearisierten Austauschvektor zur Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen werden in unterschiedlicher Verdünnung ausplattiert.

Die Selektion wird auf Anwesenheit eines Selektionsmarkergens (Neomycin) durchgeführt. Das Selektionsmedium wird alle 2-3 Tage gewechselt. Resistente Klone werden unter Selektionsdruck gepickt, vereinzelt und mit ES-WT-Medium kultiviert.

Nach Erreichen der Konfluenz werden zwei Drittel der Zellsuspension weiterkultiviert und ein Drittel zur Gewinnung genomischer DNS verwendet, die zur PCR eingesetzt wird (siehe 3.1.3). Nach Expansion der potentiell positiven Klone wird ein Teil der Zellen zu weiteren Verwendungszwecken (z.B. Blastozysteninjektion) (siehe 3.3.2) weg gefroren. Die verbleibenden Zellen werden zur genomischen DNS-Gewinnung mit anschließendem Southern-Blotting (siehe 3.1.2) und zur Karyotyp Analyse (siehe 3.3.5) eingesetzt.

3.4.1.3 Karyotyp Analyse homolog rekombinierter ES-Klone

Ein normaler Karyotyp der Maus-ES-Zellen mit 40 akrozentrischen Chromosomen ist für die Keimbahntransmission essentiell.

Die Zellen werden durch Inkubation mit Colzimid in der Metaphase der Mitose arretiert. Durch die Behandlung mit isotonischer KCl-Lösung schwellen die Zellen osmotisch an. Die Fixierung der Zellen erfolgt durch Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol-Eisessig nach Sedimentation. Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen mit einer Pasteurpipette aus 20–30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Chromosomen werden Giemsa Färbelösung angefärbt und durch Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die Objektträger werden nach dem Trocknen an der Luft mit Entellan eingedeckelt. Mindestens 20 auswertbare Chromosomenanhäufungen einzelner mitotisch arretierter Zellen werden pro ES-Klon an einem Zeiss-Axiophot mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

3.4.2 HeLa-Zellkultur

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgt in Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 10 % CO₂-Gehalt. HeLa-Zellen werden auf unbeschichteten Kulturschalen kultiviert.

3.4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HeLa-Wildtyp Zellen werden in HeLa-D10-Medium kultiviert, welches alle 2–4 Tage gewechselt wird, wobei die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90 % trypsinisiert und mit einer Verdünnung von 1:3 bis 1:10 ausplattiert werden.

Die Kulturzellen werden in Medium versetzt mit Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren (siehe 3.3.1.1). Das Auftauen der Zellen erfolgt wie bei den ES-Zellen beschrieben (siehe 3.3.1.1).

3.4.2.2 Transiente Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation

Bei der hier angewendeten Calciumphosphat-Präzipitation wird die DNS mit Hilfe von sich bildenden Kristallen in die Zellen eingebracht. Die Effizienz der Transfektion hängt erheblich von dem pH-Wert der eingesetzten Lösung ab.

Zur Transfektion werden HeLa-Zellen mit 60 % Konfluenz und 10 µg Plasmid-DNS pro 6 cm Kulturschale, welche zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert wurde, verwendet. Die DNS wird in 250 µl CaCl₂-Lösung gelöst und tropfenweise unter ständigem Schütteln in 250 µl 2-fach BBS pipettiert. Das Gemisch wird vorsichtig tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellen pipettiert. Die so behandelten Zellen werden 12 h inkubiert (3–5 % CO₂, 37°C) und anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS weitere 24–48 h in D10-Medium kultiviert (10 % CO₂, 37°C). Alle transfizierten Zellen sollten das vom jeweiligen Plasmid kodierte Protein exprimieren. Dies kann mit verschiedenen Methoden (Immunfluoreszenz-Analyse (siehe 3.7.2.2), β-Galaktosidase Nachweis (siehe 3.3.3) oder Fluoreszenzmikroskopie unfixierter Zellen durch Anregung mit UV-Licht) nachgewiesen werden.

3.5 Tierexperimentelle Arbeiten

3.5.1 Allgemeines

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes nach vorheriger Genehmigung durch die Bezirksregierung in Köln durchgeführt (Aktenzeichen 23.203.2 BN 49, 28/94 und 15/96 sowie 50.203.2 BN 49, 32/01 mit dem Titel „Untersuchung des Einflusses defekter interzellulärer Kommunikation auf die Tumorentstehung, Organentwicklung und Physiologie von Mäusen“).

3.5.2 Blastozysteninjektion (BCI)

Die Erzeugung transgener Mäuse aus embryonalen Stammzellen erfordert die Technik der Morula-Aggregation oder der Blastozysteninjektion (NAGY et al., 2003; früher HOGAN et al., 1986). Bei der hier beschriebenen Blastozysteninjektion werden embryonale Stammzellen in ein als Blastozyste bezeichnetes frühes Embryonalstadium der Maus injiziert. Das Stadium der Blastozyste ist bei der Maus Tag 3,5 nach der Befruchtung erreicht und besteht aus etwa 100 Zellen.

Die verwendeten HM-1 ES-Zellen stammen aus agouti-farbenen Mäusen (Sv129P2/OlaHsd), so dass schwarze Blastozysten-Spendertiere (C57BL/6) und Albino Empfängertiere (NMRI) verwendet werden. Dreieinhalb Tage nach der Kopulation von superovulierten Weibchen (siehe 3.5.5) mit Männchen (C57BL/6) werden Blastozysten isoliert, die homolog rekombinierten ES-Klone (siehe 3.3.1) injiziert und in den Uterus scheinschwangerer NMRI-Weibchen (siehe 3.5.4) implantiert. Bei den resultierenden Chimären gibt das Verhältnis von agouti-farbenem (ES-Zell-Spenderstamm) zu schwarzem Fell (Blastozysten-Spenderstamm) eine Auskunft über den Chimärismusgrad. Chimären mit einem Agouti-Anteil >70 % werden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Bei Keimbahntransmission der ES-Zellen weisen 50 % der agouti-farbenen Nachkommen das homolog rekombinierte Transgen auf, was durch PCR-Analysen (siehe 3.1.3) und Southern Blot Hybridisierungen überprüft wird. Diese Nachkommen werden zur Etablierung der transgene Mauslinien (siehe 3.5.6 und 3.5.7) verpaart.

3.5.2.1 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen bei konstantem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die für die jeweiligen Käfiggrößen vorgesehenen Besatzdichten werden eingehalten und die Tiere zweimal wöchentlich in saubere Käfige umgesetzt. Bezüglich der Zucht und Haltung transgener Mäuse sei auf NAGY et al. (2003) verwiesen.

3.5.2.2 Scheinschwangerschaft und Vasektomie von NMRI-Tieren

Scheinschwangeren Weibchen (NMRI) werden operativ Blastozysten implantiert, die sich einnisten (nidatieren) und die Schwangerschaft auslösen. Bleibt nach einer Scheinschwangerschaft die Nidation aus, tritt das Tier nach 11 Tagen wieder in den Zyklus ein (NAGY et al., 2003).

Die NMRI-Männchen werden operativ im Alter von etwa 6–8 Wochen durch Verödung des *Vas deferens* sterilisiert (NAGY et al., 2003). Vor Verwendung der sterilisierten Tiere zur Erzeugung scheinschwangerer Weibchen (NMRI) wird der Erfolg der Operation getestet. Die Verpaarungen werden zeitlich so geplant, dass die Weibchen am Tag 2,5 dpc der Scheinschwangerschaft sind, wenn die Blastozysten transferiert werden (siehe 3.4.2).

3.5.2.3 Superovulation von C57BL/6 Spenderweibchen

Die C57BL/6-Weibchen werden durch eine Hormonbehandlung stimuliert, wodurch eine vermehrte Follikelreifung und ein koordinierter Eisprung induziert werden. Es können bis zu 20 Blastozysten aus einem superovulierten Weibchen isoliert werden.

Für die Superovulation wird den acht Weibchen, im Alter von 4 Wochen, je 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Verpaarungserfolg am nächsten Morgen bestimmt (siehe 3.4.3)

3.5.3 Zyklusbestimmung weiblicher Mäuse

Mäuse paaren sich nur, wenn sich das Weibchen im Oestrus befindet, d.h., wenn ein Ei herangereift ist und vom Ovar in den Eileiter entlassen wird.

Der Zyklus der weiblichen Maus vollzieht sich über 4-5 Tage, in der sie die Phasen des Prooestrus, Oestrus, Metoestrus und Dioestrus durchläuft. Die verschiedenen Phasen lassen sich durch unterschiedliche Zelltypen, bei Vaginalabstrichen, charakterisieren. Im Stadium des Prooestrus sind hauptsächlich Epithelzellen zu finden. Der Oestrus zeichnet sich durch Schollen aus. Der Metoestrus weist Epithelzellen, Schollen und Leukozyten auf, wohingegen der Dioestrus durch Leukozyten und Epithelzellen charakterisiert wird.

Der Vaginalabstrich kann durch das Einführen eines Glasstabs in die Vagina und das Abstreichen des anhaftenden Zellmaterials auf einem Objektträger (0,9 % NaCl-Lösung) erfolgen. Die Zelltypen und somit der Zyklus kann direkt oder nach Methylenblaufärbung unter dem Mikroskop bestimmt werden.

3.5.4 Zucht und Verpaarungsbedingungen der Cx26^{Ki}Cx32-Mauslinie

Die heterozygoten Cx26^{26/lacZn}-Nachkommen (Cx26^{Ki}LacZ^{Ki}Cx32^{neo}) aus den Chimärenverpaarungen werden, zur Expansion der Mauslinie, mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Die Cx26^{26/lacZn}-Nachkommen werden mit Flp-Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart, um Cx26^{26/lacZ}-Tiere (Cx26^{Ki}LacZ^{Ki}Cx32) zu erhalten, welche die Neomycin-Selektionskassette genomisch deletiert haben. Die Tiere werden möglichst auf den genetischen Hintergrund des C57BL/6-Mausstammes rückgekreuzt, bevor sie zu weiteren Verpaarungen eingesetzt werden. Eine Verpaarung der Cx26^{26/lacZ}-Tiere untereinander ist nicht notwendig, da homozygote Cx26-defiziente Tiere nicht lebensfähig sind. Die Cx26^{26/lacZ}-Tiere werden mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart, um Cx26^{26/32}-Tiere zu erhalten, welche das LacZ-Reportergen genomisch deletiert haben.

3.5.5 Zucht und Verpaarungsbedingungen der Cx43^{Ki}26-Mauslinie

Die heterozygoten Cx43^{43/26neo}-Nachkommen (Cx43^{Ki}Cx26^{neo}) aus den Chimärenverpaarungen werden, zur Expansion der Mauslinie, mit C57BL/6-Mäusen verpaart und des Weiteren mit Mäusen, die die Flp-Rekombinase exprimieren. Die resultierenden Tiere haben die Neomycin-Selektionskassette genomisch

deletiert (Cx43^{43/26}-Tiere; Cx43KICx26). Die Rückkreuzung wird auf den genetischen Hintergrund der C57BL/6-Tiere durchgeführt. Heterozygote Cx43^{43/26}-Tiere werden zur Zucht homozygoter Cx43^{26/26}-Tiere miteinander verpaart. Die Besonderheit bei Verpaarungen mit heterozygoten Weibchen ist, dass Ammenmütter zur Aufzucht der Jungtiere benötigt werden.

3.5.6 Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums

Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wurde von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Erfolgreiche Verpaarungen wurden am Anfang der folgenden Lichtphase anhand des als Vaginalpfropf erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach Kopulation wurde als 0,5 dpc (dies post coitum) definiert.

3.5.7 Präparation von postimplantiven Mausembryonen

Die Muttertiere wurden in geeigneter Phase der Schwangerschaft durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus vollständig entnommen. Nach Skizzierung der Lage und der Größe der Implantationskammern wurden die Embryonen in kaltem PBS- ggf. unter einem Dissektionsmikroskop (Wild) entsprechend den Vorgaben in HOGAN et al. (1994) freipräpariert. In frühen postimplantiven Stadien wurden bei Bedarf die extraembryonalen Membranen für die Bestimmung des Genotyps durch PCR verwendet (siehe 3.1.3). Bei späteren fötalen Stadien wurde die Schwanzspitze zu diesem Zweck abgeschnitten.

3.6 Funktionale Analysen an transgenen Tieren in toto

3.6.1 EKG-Messungen

EKG-Messungen werden an zehn Tage alten und adulten Tieren nach HAGENDORFF et al. (1999) durchgeführt. Dazu werden Oberflächen-EKGs mit 6 Ableitungen auf einem Mehrkanal-Verstärker aufgezeichnet und in digitale Signale umgewandelt. EKG-Kanäle werden verstärkt, zwischen 10 und 100 Hz gefiltert und mit einer Rate von 1 kHz aufgezeichnet. Die spontane Herzzykluslänge, Herzschlagfrequenz, Dauer der P-Welle, PQ-Intervall, QRS-Dauer und QT-Intervall werden von den Messungen nachträglich (offline) bestimmt. Aus 300 bis 1200 Herzzyklen der 6 Ableitungen werden Signal-gemittelte EKG-Profile (SAECG, Signal averaged ECG) berechnet. Auf dieser Grundlage wurden die im Anschluss beschriebenen Zeiten gemessen. Die QRS-Dauer ist das Intervall zwischen Beginn der Q-Zacke und Rückkehr der S-Zacke zur isoelektrischen Linie. Das QT-Intervall wird gemessen, als der Zeitraum, vom Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle, definiert als Rückkehr der T-Welle zur Grundlinie. Das QT-Intervall wird nachträglich bezüglich der Herzfrequenz korrigiert (QT_C), entsprechend MITCHELL et al. (1998). Diese Analysen wurden

zusammen mit Alexander Ghanem (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin – Kardiologie/Pneumologie, Bonn) durchgeführt.

3.6.2 Elektrophysiologische Untersuchungen (EPI) an adulten Mäusen

Adulte Mäuse werden *in vivo* mittels einer invasiven Einzel-Katheter Untersuchung (octapolar electrophysiologic catheter, Ciber Mouse, NuMed, NY, USA) elektrophysiologisch charakterisiert. Die Präparation und Charakterisierung der Halsvene und elektrophysiologischen Untersuchungen (EPI) wurden unter inhalativer Anästhesie (1,5 Vol.-% Isofluran in 70 % N₂O und 30 % O₂) und konstanter Körpertemperatur von 37°C durchgeführt. Die EPI beinhaltet intrakardiale atriale und ventrikuläre Stimulation. EKG-Messungen (RR-Intervall, Dauer der P-Welle, PQ-Intervall, QRS-Dauer, QT-Intervall) und elektrophysiologische Parameter (Sinusknotenrefraktärzeit, Wenckebach-Periodizität, 2:1 atrio-ventrikuläre Leitfähigkeit, AV-Knotenrefraktärperiode, VA-Übertragungseigenschaften) wurden ausgewertet. Induzierbarkeit und Auftreten atrialer und ventrikulärer Tachyarrhythmien wurden mittels programmierter (bis zu drei Extra-Schläge) und plötzlichen Stimulationsprotokollen getestet. Der „*pace* threshold current“ war $1,01 \pm 0,56$ mA bei 1 ms Stimulierungsdauer. Zweifache „*pace* threshold“ rechteckige Stimulierungspulse wurden, durch einen modifizierten, programmierbaren Stimulator mit S1S1 Zykluslänge (CL) bis zu 10 ms (Model 5328; Medtronic, Minneapolis, MN, USA), ausgeübt. Atrial Fibrillationen länger andauernd als 1 sec. werden ausgewertet und ventrikuläre Tachykardien werden bei ≥ 4 ektopische, ventrikuläre Schläge. Nach Amplifizierung und Filtern werden die Daten (RR-Intervall, Dauer der P-Welle, PQ-Intervall, QRS-Dauer, QT-Intervall) mit einem Maßstab von 4 kHz (Bard stamp amplifier; Bard LabSystem, C.R. Bard Inc., New Jersey, USA) gesammelt. Diese Analysen wurden zusammen mit Jan Schrickel (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin – Kardiologie/Pneumologie, Bonn) durchgeführt.

3.6.3 Statistische Auswertung

Die Messdaten sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung oder dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für die statistischen Auswertungen wird das Programm GraphPad Prism (Graphpad Software Inc.) verwendet. Vergleiche von mehr als zwei unterschiedlichen Gruppen erfolgen mittels Ein-Wege-ANOVA und post-hoc Tuckey Test. In allen Fällen werden Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3.7 Analysen an transgenen Mäusen

Für die beschriebenen Präparationen werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, wenn nicht anders erwähnt. Die zu untersuchenden Organe werden nach der Entnahme auf Trockeneis oder in

Stickstoff eingefroren, bei -70°C gelagert oder sofort weiterverwendet. Je nach Verwendungszweck kann eine erste Fixierung mit 4 % PFA (Paraformaldehyd), 0,2 % Glutaraldehyd oder Bouin-Lösung zur besseren Gewebeerhaltung von Vorteil sein.

Die präparierten Embryonen und Organe wurden für nachfolgend aufgeführte Methoden eingesetzt, Anfertigung von Gefrier- (10-20 µm; siehe 3.5.1.1), Dick- (200 µm; siehe 3.5.1.1) und Paraffinschnitten (7 µm; siehe 3.5.1.1), β -Galaktosidase-Nachweise (siehe 3.6.2.1), Immunfluoreszenzen (siehe 3.7.2.2), RT-PCR (siehe 3.1.4), Southern Blot und Western Blot Analysen.

3.7.1 Histologische Analysen

3.7.1.1 Herstellung von Gefrier-, Dick- und Paraffinschnitten

Zur Erstellung von Gefrierschnitten (10-20 µm) werden die gefrorenen Organe in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet, an einem Kryostaten (Microm) geschnitten und auf SuperFrost-Plus-Objektträgern (Menzel-Gläser) aufgenommen. Die Trocknung der Schnitte wird durch eine Inkubation bei RT für mindestens eine Stunde erzielt, nach der die Dünnschnitte bei -70°C gelagert werden können.

Zur Herstellung von Dickschnitten (Leber und Gehirn) werden die Mäuse perfundiert. Hierzu werden sie mit 100 µl je 10 g Lebendgewicht Ketavet/Rompun-Lösung betäubt. Das Blut wird durch eine Kanüle im linken Herzventrikel und Anschneiden des rechten Atriums mit PBS⁻ (10 ml) ausgewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgt mittels einer 4 %-igen PFA-Lösung (20 ml). Die Organe werden nach Entnahme in 4 %-iger PFA-Lösung nachfixiert. Das jeweilige Organ wird auf dem Objektträger mittels handelsüblichen Sekundenklebers fixiert und in ein Vibratom VT1000S (Leica) eingespannt. Die Dickschnitte variieren zwischen 200-400 µm, die in einem mit PBS⁻ gefüllten Behälter aufgefangen werden. Die einzelnen Schnitte werden mit Hilfe eines Pinsels in ein Gefäß mit PBS⁻ überführt.

Die Gewebe werden entsprechend ihrer Größe fixiert und anschließend mehrfach in PBS⁻ gewaschen. Entwässerung und Infiltration mit flüssigem Paraffin erfolgen über Nacht mittels des Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020. Die Proben werden in gefensterter Plastikkassetten eingeschlossen und mittels eines Schwenkkorbes in ständiger Bewegung unter Vakuum sukzessive einer ansteigenden Ethanolreihe, Xylol und flüssigem Paraffin ausgesetzt. Danach werden die Präparate mit Hilfe der Paraffinausgießstation EG 1140H in Metallgießformen in Paraffin eingebettet. Die Schnitte (7 µm) werden mittels des Paraffin-Schnitt-Transfersystems mit Rotationsmikrotom HM 360 hergestellt. Aus dem 42°C warmen Wasser-Auffangbecken werden die Schnitte nach Streckung mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger aufgenommen und an der Luft getrocknet. Die Schnitte werden bei RT gelagert.

3.7.1.2 Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung an Gefrier- und Paraffinschnitten

Bei dieser Methode handelt es sich um eine schnell auszuführende Übersichtsfärbung. Hämatoxilin färbt die Zellkerne durch Anlagerung an die negativ geladene DNS blau an, wohingegen Eosin, als schwach saurer Farbstoff, das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern rot anfärbt. Die Intensität der Färbung kann durch die Dauer der Farbstoffeinwirkung beeinflusst werden.

Paraffinschnitte werden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Dazu werden die Objektträger 1 ½ min. in Xylol und anschließend für je 1 min. in absolutem, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 % und 50 % Ethanol inkubiert. Nach 5 min. Inkubation in A. bidest. erfolgt eine 3-minütige Kernfärbung in Hämatoxilin-Lösung. Gefrierschnitte können direkt zur Kernfärbung eingesetzt werden. Die Präparate werden unter fließendem Wasser differenziert und anschließend für 5 min. im warmen Wasser „gebläut“. Die Präparate werden für 15-30 min. mit Eosin gefärbt und mit fließendem Wasser differenziert. Die Gefrierschnitte werden direkt nach dem Trocknen mittels Entellan eingedeckelt. Die Paraffinschnitte werden entwässert, wobei sie für jeweils 30 sec. in 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und absolutem Alkohol sowie Xylol inkubiert werden. Anschließend werden sie wie die Gefrierschnitte mittels Entellan eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.7.1.3 Histologische Analyse von Brustdrüsen

Neben der analytischen Histologie an HE-gefärbten Paraffinschnitten, durchgeführt von Prof. Dr. E. Winterhager (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen) wurden Gänge und Endstücke der Brustdrüse, zur Untersuchung der Differenzierung, spezifisch mit Carmin-Aluminium dargestellt (<http://mammary.nih.gov/tools/index.html>).

3.7.1.4 Darstellung von Brustdrüsenepithel in toto

Die Haut über der Mamma inguinalis wurde vorsichtig entfernt, die Brustdrüse mit einem Skalpell vom Bauchfell gelöst, auf einem Objektträger (Superfrost®-Plus) ausgebreitet und bei RT in einem Ethanol/Chloroform/Eisessig-Gemisch (6:3:1) fixiert. Das Präparat wurde anschließend in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und durch eine Ethanolreihe in A. bidest überführt. Die Färbung erfolgte in Carmin-Aluminium-Färbelösung (0,2 % (w/v) Carmine, 0,5 % (w/v) Aluminium-Kaliumsulfat in A. bidest unter Kochen gelöst und filtriert). Anschließend wurde das Präparat durch eine Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckelt.

3.7.1.5 Histologie von Gonaden

Die Gonaden (Ovar/Uterus und Testis, einschließlich Epididymis) werden präpariert und in Bouin-Lösung fixiert. Die analytische Histologie erfolgte mittels HE-gefärbter Paraffinschnitte durch Prof. Dr. E. Winterhager (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen).

3.7.1.6 Immunhistochemische Detektion von Androgenrezeptoren

Paraffinschnitte von Bouin-fixierten Hoden wurden rehydriert und durch Mikrowellen in Glyzinpuffer (0,05 M) für 10 min. (1200 W) behandelt. Die Blockierung der unspezifischen Bindestellen erfolgte durch einen 30-minütigen Inkubationsschritt in Blockierungslösung (DakoCytomation Cyprinteria, CA, USA, S3022). Polyklonale Kaninchen-Antikörper, gerichtet gegen das N-terminale Peptid des Androgenrezeptors menschlichen Ursprungs, die ebenfalls die Androgenrezeptoren der Maus und Ratte erkennen (SC-; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), wurden in einer Verdünnung von 1:800 in Blockierungslösung verwendet. DakoCytomation Universal LSAB Plus-kit, einschließlich biotinylierter Sekundärantikörper Polymer und Streptavidin konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP) werden zum Nachweis der gebundenen Primärantikörper eingesetzt (nach Herstellerangaben). New Fuchsin Chromogen wird als Substat für die AP genommen und mit Hämatoxilin gegengefärbt. Endogene alkalische Phosphatase wird durch Zugabe von Levamisol zum Substrat inhibiert. Kontrollfärbungen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die analytische Histologie wurde durch Dr. R. Behr (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen) durchgeführt.

3.7.1.7 Histologie von Embryonen (17 dpc)

Die Embryonen wurde präpariert (siehe 3.5.7) und in Bouin-Lösung fixiert. Die Genotypisierung erfolgte anhand der äußeren Embryonalhülle (siehe 3.1.3). Die analytische Histologie erfolgte mittels HE-gefärbter Paraffinschnitte durch Prof. Dr. E. Winterhager (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen).

3.7.1.8 Histologie adulter Herzen

Nach Präparation des Herzens und der Lunge werden die Lungenlappen und der Thymus unter Erhalt des Herzgefäß-Baumes abpräpariert. Die Herzen werden über Nacht bei 4°C in 4 % PFA rotierend fixiert. Die Proben werden mehrfach gewaschen, in 70 % Ethanol gelagert und zur weiteren Analyse zu Dr. J.-S. Kim nach Seoul, Korea (University of Ulsan, College of Medicine) verschickt. Hier erfolgte Routine-Histologie durch Einbettung in Paraffin, Anfertigung von Längsschnitten der Herzen und HE-Färbung.

3.7.2 Expressionsanalysen

3.7.2.1 β -Galaktosidase-Nachweis

Der histologische Nachweis bakterieller β -Galaktosidase als Produkt des verwendeten lacZ-Reportergens wurde verändert nach HOGAN et al. (1994) mit X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) durchgeführt. Das Basisprotokoll wurde je nach Verwendungszweck leicht modifiziert.

Die Fixierung erfolgte in LacZ-Basislösung mit Glutaraldehyd. Anschließend wurden die Präparate – soweit nicht anders vermerkt – dreimal mit LacZ-Waschlösung gewaschen und üN mit LacZ-Färbelösung bei 37°C gefärbt. Nach der Reaktion wurden die Präparate dreimal mit LacZ-Waschlösung und einmal mit A. bidest gewaschen. Besonderheiten bei den verschiedenen Präparaten sind im Folgenden beschrieben:

Kulturzellen. Für den *in situ*-Nachweis von β -Galaktosidase in adhärent wachsenden Kulturzellen wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, für 5 min. fixiert und anschließend dreimal gewaschen. Nach der Färbung wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und unter einem Binokular (Wild) im Durchlicht betrachtet und fotografiert.

Gefrierschnitte: Nach dem Trocknen wurden die Schnitte fixiert, gewaschen und gefärbt. Nach der Färbung wurde gewaschen, gefolgt von einem zusätzlichen Schritt in A. bidest und in Entellan eingedeckelt.

Dickschnitte: Die Dickschnitte werden in LacZ-Fixierlösung fixiert, dreimal mit LacZ-Waschlösung gewaschen und über Nacht in LacZ-Färbelösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in LacZ-Waschlösung können die Dickschnitte bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C in LacZ-Waschlösung gelagert werden.

Postimplantive Mausembryonen: Die Embryonen zwischen 7,5 dpc und 11,5 dpc wurden nach Entnahme (siehe 3.5.7) als ganzes gefärbt („*whole mount*“). Nach einem Waschschrift in PBS⁻ wurden die Embryonen ihrer Größe entsprechend fixiert. Anschließend wurden sie gewaschen, über Nacht gefärbt und erneut gewaschen. Die Embryonen wurden je nach Transparenz unter einem Binokular (Wild) im Durchlicht oder Dunkelfeld betrachtet und fotografiert.

3.7.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten (u. LacZ-Nachweis)

Die Methode der Immunfluoreszenz ermöglicht durch den Einsatz spezifischer primärer und Farbstoffgekoppelter sekundärer Antikörper eine *in situ* Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle oder Zellverbänden.

Die Fixierung der Gefrierschnitte erfolgt für 10 min. in Küvetten mit eiskaltem absolutem Ethanol. Anschließend wird mit PBS⁻ gewaschen und mit Blockierungslösung für 45-60 min. bei RT inkubiert. Bei

von Propidiumjodid wird vor der Blockierung eine 30-minütige Inkubation mit RNase2000 bei RT durchgeführt. Je Gefrierschnitt werden 50-100 µl der primären Antikörper-Verdünnung (in Blockierungslösung) verwendet und mit Parafilm abgedeckt. Die Inkubation erfolgt entweder für 1-2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer „feuchten Kammer“. Nach kurzen Waschschritten werden die Schnitte mit verdünnten, sekundären Antikörpern (aus Ziege oder Esel stammendes IgG anti-F_C-Kaninchen, Meerschweinchen oder Maus), der mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (z.B. Alexa 488, Alexa 594, Cy3, Cy5 etc.) gekoppelt ist, 45-60 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend wird noch einmal mit PBS⁻ gewaschen und mit dem Kernfarbstoff Hoechst (1:2000 in PBS⁻) oder Propidiumjodid (1:50000 in PBS⁻) für 10 min. (abgedunkelt) inkubiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation in ddH₂O werden die Proben mit DAKO^R Fluorescent Mounting Medium oder Permafluor eingedeckelt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Das Eindeckelmedium ist nach einem Tag erstarrt und die Präparate lassen sich mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskop (Hoechst) oder Laser Scan Mikroskop (Propidiumjodid) betrachten.

Immunfluoreszenz-Analysen und β -Galaktosidase-Nachweis (siehe 3.7.2.1) können an einem Schnitt erfolgen. Dabei ist die Reihenfolge egal, solange keine Fixierungsschritte mit Ethanol verwendet werden.

3.7.2.3 Immunfluoreszenz-Analysen an Dickschnitten (u. LacZ-Nachweis)

Anders als bei Gefrierschnitten werden Dickschnitte 10 min. in 4 % PFA (oder \ddot{u} N 1 % PFA, 4°C) bei RT fixiert. Die jeweiligen Schritte werden in einem Eppendorfgefäß durchgeführt und die Inkubation erfolgt meist rotierend auf einem „Sonnenrad“. Vor der 20-30-minütigen Inkubation mit RNase2000 (1:100) werden die Schnitte dreimal kurz mit OLDENBURG-Puffer gewaschen. Die Blockierungslösung wird in OLDENBURG-Puffer angesetzt und für 1-2 Stunden bei RT auf die Schnitte gegeben (1 ml Flüssigkeit + 2 Schnitte in Eppendorfgefäß). Die Schnitte werden mit PBS⁻ gewaschen und mit dem verdünnten, primären Antikörper (in Blockierungslösung) für 1-2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Vor und nach der Inkubation (1-2 Stunden) mit den verdünnten, sekundären Antikörpern werden die Schnitte mit PBS⁻ gewaschen. Die Schnitte werden vorsichtig mit Hilfe eines Pinsels auf einem Objektträger aufgebracht und mit DAKO^R Fluorescent Mounting Medium oder Permafluor eingedeckelt und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Eine zusätzliche Anwendung des β -Galaktosidase-Nachweis (siehe 3.7.2.1) kann sowohl vor der Immunfluoreszenz-Analyse als auch danach erfolgen. Es ist darauf zu achten, dass keine Fixierungsschritte mit Ethanol durchgeführt werden, da dies der LacZ-Nachweisreaktion schadet. Bei der Anwendung danach werden die Schnitte nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern und Waschen mit PBS⁻ mit 4 % PFA für 15 min. fixiert, bevor noch einmal mit LacZ-Waschlösung gewaschen wird und sich die Inkubation mit LacZ-Färbelösung über Nacht anschließt.

3.7.3 FSH-Messungen an Serum und Hypophyse

Zur Durchführung der FSH-Messungen wurden den Mäusen Blut durch Ausbluten entnommen und die Hypophysen präpariert, die auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert wurden. Das entnommene Blut wird unmittelbar nach der Entnahme in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt und zur Serumgewinnung 30 min. bei 37°C inkubiert. Es schließt sich eine 1h Inkubation bei 4°C und eine Zentrifugation (3000 Upm, 20 min, 4°C) an, nach der das gelbliche Serum vorsichtig vom Blutkuchen abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt wird. Das so erzielte Serum lässt sich bei -20°C lagern, sollte aber nicht oft aufgetaut und eingefroren werden. Das Serum kann zum Schutz vor Bakterien- und Pilzwachstum mit Natriumazid (NaN_3) zu einer finalen Konzentration von 0,02 % versetzt werden.

Die FSH-Messungen werden im Labor von Prof. Dr. M. Simoni (Institut für Reproduktionsbiologie, Universität Münster) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

Das Projekt: Cx26KILacZKICx32

Zur Untersuchung funktioneller Spezialisierung und Redundanz unter den einzelnen Mitgliedern der Connexin Familie *in vivo* wurden Mäuse mit einem gezielten Ersatz der kodierenden Region des Connexin26 Gens durch die kodierende Region des Connexin32 Gens erzeugt. Zusätzlich wurde eine Expressionsanalyse durch das Einbringen eines Reportergens (NLS-LacZ) ermöglicht.

4.1.1 Klonierung des Austauschvektors pCx26KILacZKICx32neo

Die Klonierung des Austauschvektors erfolgte über mehrere Schritte, die im Folgenden zuerst in einer Gesamt-Übersicht präsentiert werden. Anschließende Erläuterungen zeigen wesentliche Aspekte der Klonierungsstrategie auf. Die aufgeführten Vektoren sind im Abschnitt 2.12 (Vektorkarten im Anhang) gesondert aufgeführt.

- Austausch des 5'-Homologiebereichs im Ausgangsvektor 'Cx26 8 kb-Subklon' ('Cx26 8 kb 5'UTRneu')
- Klonierung eines Vektors mit Cx26-Spleißakzeptorstelle (SA) und kodierender Region (CR) von Cx32 ('SACx26KI32CR *SmaBam* delta *SphI*')
- Klonierung der Neomycin-Resistenzkassette mit flankierenden *frt*-Erkennungsstellen und zusätzlichen *NsiI*-Schnittstellen ('*frt*-neo-*frt* 2x *NsiI*')
- Klonierung eines Vektors mit Cx26-Spleißakzeptorstelle (SA), NLS-LacZ-Reportergen und flankierenden *loxP*-Erkennungsstellen (*loxP*-SACx26NLS-LacZ-*loxP*)
- pCx26KILacZKICx32neo: Zusammenfügen der beschriebenen Teilprodukte

4.1.2 Klonierungsstrategie

4.1.2.1 Austausch des 5'-Homologiebereichs im Ausgangsvektor 'Cx26 8 kb-Subklon'

Der Ausgangsvektor 'Cx26 8 kb-Subklon' wurde vor Klonierungsbeginn mittels Spaltung und Sequenzierung der wesentlichen Bereiche umfassend analysiert. Das Spaltungsmuster gab keinen Aufschluss über eventuell abweichende Sequenzen. Die Sequenzanalyse des 5'-Homologiebereichs zeigte jedoch nur eine 600 bp große Übereinstimmung (anstelle der angegebenen 1,8 kb) mit der vorliegenden Cx26-Sequenz, weshalb weitere Klonierungsschritte notwendig wurden. Im 3'-Homologiebereich konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

Der 5'-Homologiebereich wurde mit den modifizierten Startermolekülen Cx26_for und Cx26_UTR_Sma amplifiziert und in den Ausgangsvektor 'Cx26 8kb-Subklon' eingebracht. Der Vektor 'Cx26 8 kb 5'UTR' zeigte eine durch Mutationen entstandene, zusätzliche *NotI*-Schnittstelle im 3'-Homologiebereich und machte den Austausch des 3'-Homologiebereichs notwendig. Die 3'-Region wurde aus dem 'Cx26 8 kb-Subklon' über die Schnittstellen *NsiI* und *EcoRI* ausgeschnitten und in den Vektor 'Cx26 8 kb 5'UTR' überführt. Die Sequenzierungen des 5'-Homologiebereichs des Vektors 'Cx26 8 kb 5'UTRneu' stimmten mit den vorliegenden Cx26-Daten (Celera-Datenbank) überein.

4.1.2.2 Klonierung der kodierenden Region von Cx32

In dem resultierenden Vektor ('SACx26Ki32CR *SmaBam* delta *SphI*') wurde die Cx26-Spleißakzeptorstelle (SACx26) vor die kodierende Region des Cx32-Gens (Cx32CR) kloniert.

Hierzu wurde das SACx26-Fragment (106 bp) mit den modifizierten Startermolekülen Cx26SMA2 und Cx26_Sma aus 'Cx26 8 kb-Subklon' amplifiziert und über die *SmaI*-Schnittstellen in den pBluescript SKII(+)-Vektor eingebracht. Der entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung 'pBSK Cx26SMA2'. Die kodierende Region von Cx32 (894 bp) wurde ebenfalls über PCR (Cx32_*Sph* u. Cx32_*NsiBam*) amplifiziert und in den *SphI/Bam*HI-linearisierten Vektor 'pBSK Cx26SMA2' kloniert. Die entstandene *SphI*-Schnittstelle in dem Vektor 'SACx26Ki32CR *SmaBam*' wurde durch Spaltung des Vektors mit *SphI*, T4-DNS-Polymerase Behandlung und Re-Ligation entfernt. Die Sequenzierung des Vektors 'Cx26Ki32 *SmaBam* delta *SphI*' zeigte keine Veränderungen in der kodierenden Region der Cx32-Sequenz und es konnte nachgewiesen werden, dass die *SphI*-Schnittstelle entfernt wurde.

4.1.2.3 Klonierung der Neomycin-Resistenzkassette

Die Neomycin-Resistenzkassette musste durch *frt*-Erkennungs- und *NsiI*-Schnittstellen flankiert werden ('*frt*-neo-*frt* 2x*NsiI*'). Die *NsiI*-Schnittstellen wurden über einen so genannten 'Spacer Vektor' eingebracht. Der 'Spacer' wurde mittels PCR aus dem Vektor pBluescript SKII(+) mit den Startermolekülen Neo_for und Neo_rev amplifiziert und über die Schnittstellen *SmaI* und *Bam*HI in den linearisierten Vektor pBluescript SKII(+) ligiert. '*frt*-neo-*frt*' wurde über *Hind*III ausgeschnitten und in den 'Spacer Vektor' kloniert. Somit stand der Vektor '*frt*-neo-*frt* 2x*NsiI*' mit Neomycin-Resistenzkassette, *frt*-Erkennungsstellen und zwei *NsiI*-Schnittstellen für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung.

4.1.2.4 Klonierung des NLS-LacZ-Reportergens

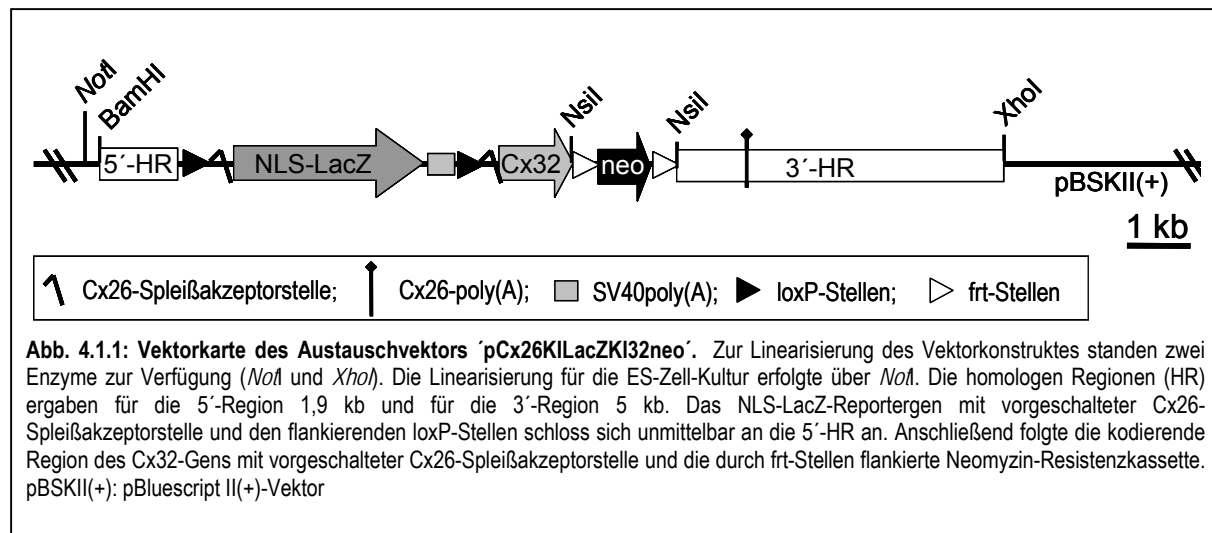
Das NLS-LacZ-Reportergen wurde für die Anwendung in dem finalen Konstrukt hinter die Cx26-Spleißakzeptorstelle und zwischen die beiden loxP-Erkennungsstellen kloniert. Als Ausgangsvektor für diese

Schritte wurde wiederum der 'Spacer Vektor' (siehe 4.1.2.3) eingesetzt. Das NLS-LacZ-Reportergen wurde aus dem Ursprungsvektor 'NLS-lacZpA' ausgeschnitten und in den 'Spacer Vektor' eingefügt ('NLS-LacZ *SmaNsi*'). Das SACx26-Fragment (Cx26_*Sma* u. Cx26SA_*NcoI*) wurde amplifiziert und vor das NLS-LacZ kloniert. Aus dem entstandenen Vektor 'SACx26 NLS-LacZ *SmaNsi*' wurde das Konstrukt über *SmaI* und *SalI* ausgeschnitten und zwischen loxP-Erkennungsstellen kloniert. Der fertige Vektor mit Cx26-Spleißakzeptorstelle, NLS-LacZ-Reportergen und flankierenden loxP-Stellen erhielt die Bezeichnung 'loxP-SACx26 NLS-LacZ-loxP'.

4.1.2.5 pCx26KILacZKICx32neo, der finale Austauschvektor

Zur Fertigstellung des finalen Konstruktes (siehe Abb. 4.1.1) mussten alle zuvor beschriebenen Teilprodukte – 'Cx26 8 kb 5'UTRneu', 'SACx26KI32CR *SmaBam* delta *SphI*', 'frt-neo-frt 2xNsiI' und 'loxP-SACx26NLS-LacZ-loxP' - vereint werden.

Als Ausgangsvektor wurde der Vektor 'Cx26 8 kb 5'UTRneu' verwendet. Die kodierende Region von Cx26 wurde zuerst gegen die kodierende Region von Cx32 mit Cx26-Spleißakzeptorstelle (aus dem Vektor 'SACx26KI32CR *SmaBam* delta *SphI*') ausgetauscht. Dies erfolgte über die Spaltung mit *SmaI* und *NsiI* und führte zu dem Vektor 'Cx26KI32'. In diesen Vektor wurde im 5'-Bereich über *SmaI* das 'loxP-SACx26NLS-LacZ-loxP'-Fragment und im 3'-Bereich über *NsiI* das 'frt-neo-frt 2xNsiI'-Fragment ligiert. Die Sequenzen des finalen Austauschvektors 'pCx26KILacZKICx32neo' wurden mittels umfassender Restriktionsanalysen und Sequenzierungen bestätigt.



4.1.2.6 PCR-Testvektor und Etablierung der ES-PCR-Strategie

Im Zuge der beschriebenen Klonierungsstrategie wurde ein zusätzlicher Vektor konzipiert, der für die Etablierung einer Test-PCR eingesetzt wurde. Die PCR in homolog-rekombinierten ES-Zellen erfolgte über den 5'-Homologiebereich.

Mit modifizierten Startermolekülen (Cx26_T_for u. Cx26_Test_rev) wurde ein 158 bp großes Fragment aus genomischer DNS amplifiziert, welches sich stromaufwärts der eingezeichneten 5'-HR befand und in eine verkürzte Version des 'pCx26KILacZKICx32neo'-Vektors kloniert wurde. Die PCR wurde mit den Startermolekülen Cx26for und Cx26rev für das 2,9 kb große Wildtyp-Fragment und mit Cx26for und LacZrev1 für den Nachweis des 2,3 kb großen „Knock In“-Allels durchgeführt. Die Test-PCR (Daten nicht gezeigt) lieferte bis zu einer Verdünnung von 300 fg des Testvektors ein Signal der erwarteten Größe. Die Sequenzen der Startermoleküle (siehe 2.15), PCR-Ansatz und -Programm ist in Abschnitt 3.1.3 dargestellt.

4.1.3 Nachweis der Funktionalität des NLS-Reportergens und des Flp/frt-, Cre/loxP-Systems

4.1.3.1 Überprüfen der Funktionalität des LacZ-Reportergens in HeLa-Zellen

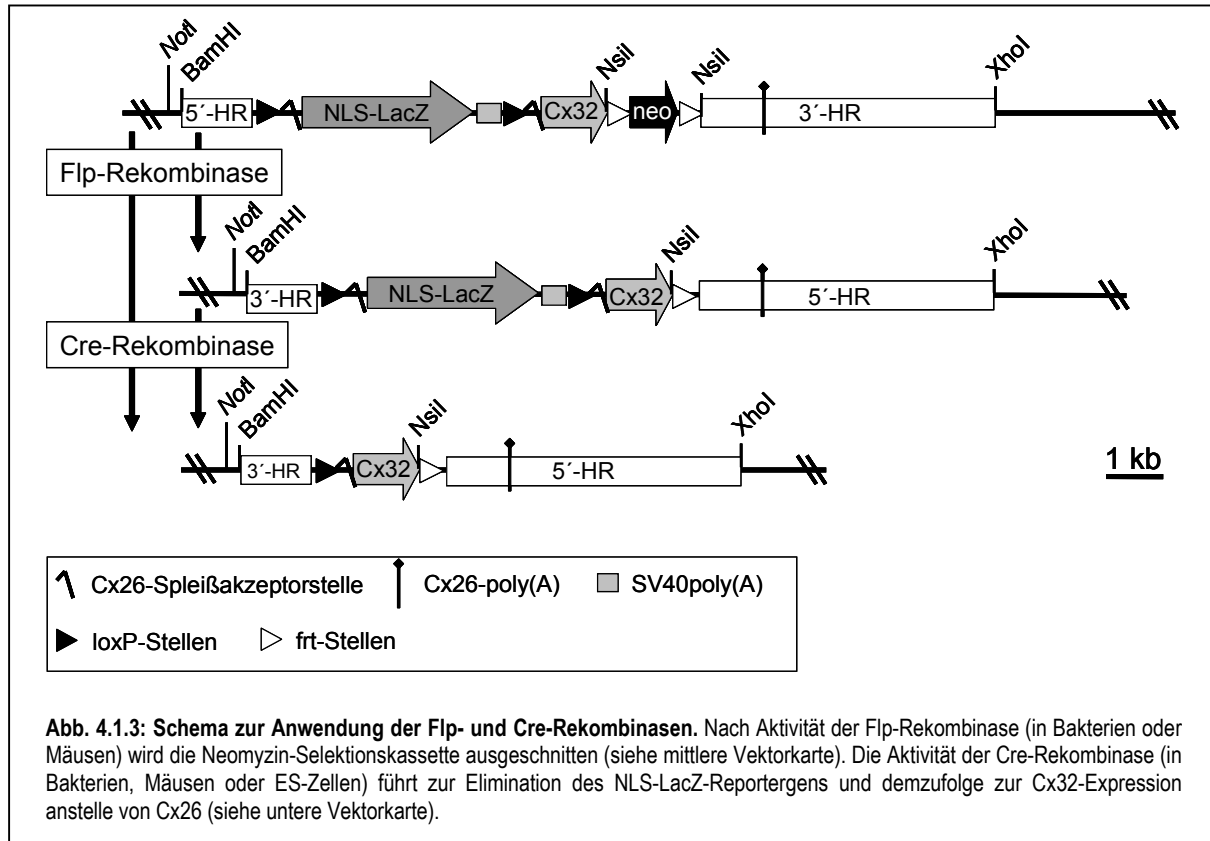
Die Funktionalität des Reportergens wurde in HeLa-Zellen sichergestellt. Hierzu wurde das SACx26NLS-LacZ-Reportergen in den pBS-CMV-Intron-BS-NLS-lacZ-Vektor (siehe 2.11) kloniert und anschließend in HeLa-Zellen transient transfiziert. Die Funktionalität des LacZ-Reportergens konnte durch Inkubation mit β -Gal-Substratlösung und der daraus resultierenden Blaufärbung der Zellen dokumentiert werden (siehe Abb. 4.1.2).



Abb. 4.1.2: Funktionalität des LacZ-Reportergens mit vorgeschalteter Cx26-Spleißakzeptorstelle in HeLa-Zellen

4.1.3.2 Nachweis der Funktionalität des Flp/frt- und Cre/loxP-Systems

Die Funktionalität der einbrachten frt- und loxP-Sequenzen in dem Austauschvektor wurde über die jeweiligen Frt- bzw. Cre-exprimierenden *E.coli* Stämme (siehe 2.13) erbracht. Spezifische Spaltungsmuster (Daten nicht gezeigt) der isolierten DNS zeigten die An- bzw. Abwesenheit der Neomycin-Resistenzkassette (Flp) oder des LacZ-Reportergens (Cre) (siehe Abb. 4.1.3).



4.1.4 Erzeugung der Cx26^{26/LacZn}-Mauslinie

Die Erzeugung der Mauslinie umfasste die Teilaspekte der embryonalen Stammzellkultur, Blastozysteninjektion und Verpaarung chimärer Nachkommen. Die Genotypen der resultierenden Mauslinien wurden wie folgt abgekürzt: Cx26^{26/LacZn} (Cx26KILacZKICx32neo), Cx26^{26/LacZ} (Cx26KILacZKICx32) und Cx26^{26/32} (Cx26KICx32) (siehe Abb. 4.1.4).

4.1.4.1 Embryonale Stamm (ES)-Zell-Kultur

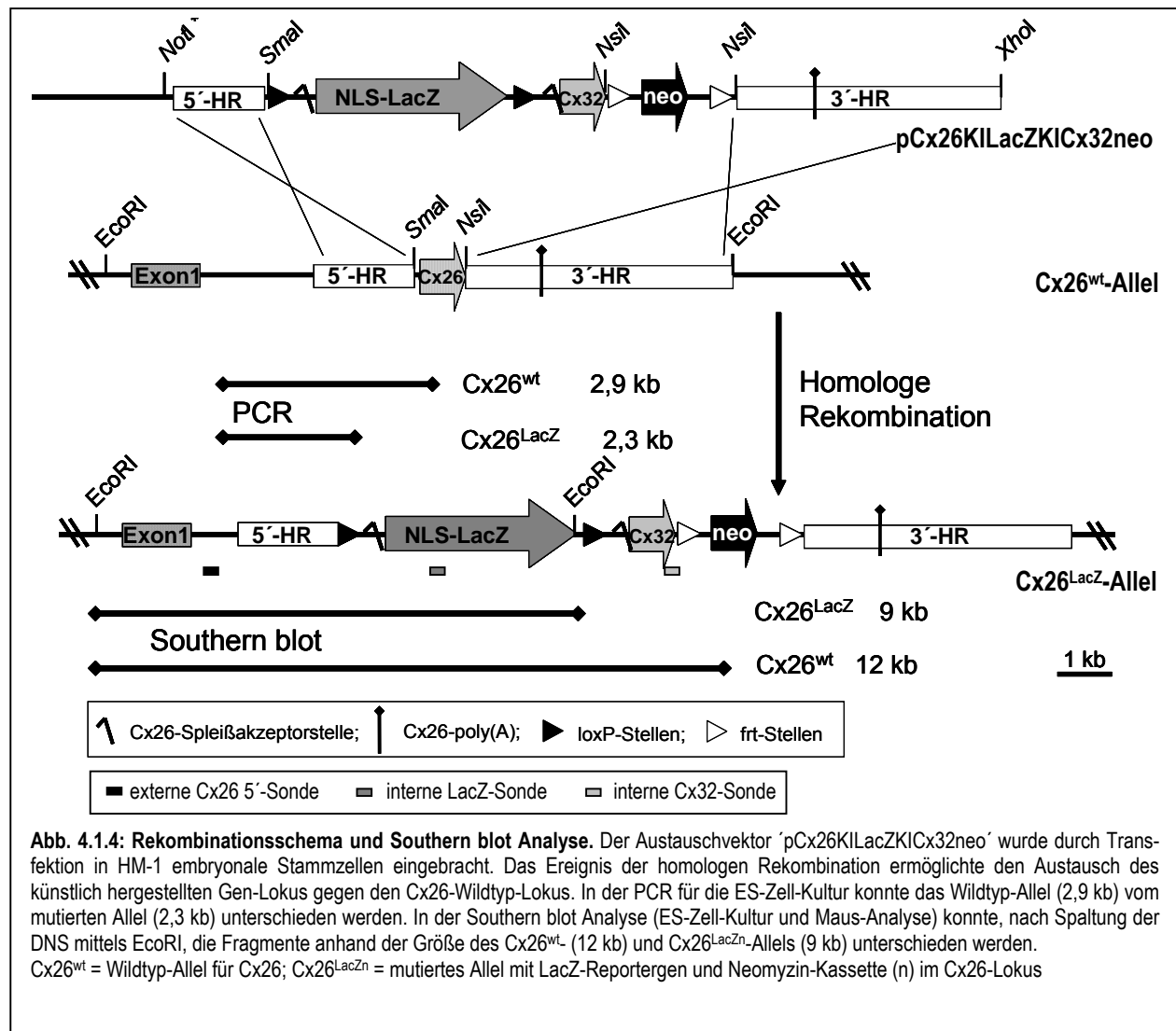
Der Austauschvektor pCx26KILacZKICx32neo wurde nach Restriktion (*NotI*) in embryonale Stammzellen (HM-1; MAGIN et al., 1992) transfiziert.

4.1.4.1.1 Analyse der ES-Zell-Klone

Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen in G418-haltigem Medium kultiviert und selektioniert. Daraus resultierten 680 Klone, die expandiert und analysiert wurden. Die Klone wurden durch PCR-Analyse (Daten nicht gezeigt) charakterisiert und 300 Klone zusätzlich einem β -Galaktosidase-Test (Daten nicht

gezeigt) unterzogen. Die nach LacZ-Färbung vermeintlich positiven Klone zeigten jedoch kein PCR-Signal. Der einzige PCR-positive Klon (Klon 140) zeigte keine Blaufärbung nach dem β -Galaktosidase-Nachweis.

Eine Southern Blot Analyse (Daten nicht gezeigt) mit dem PCR-positiven Klon sowie einigen β -Galaktosidase-positiven Klonen führte zu den erwarteten Fragmentgrößen: ein 12 kb Fragment für das Cx26^{wt}- und ein 9 kb Fragment für das Cx26^{LacZ}-Allel (siehe Abb. 4.1.4). Als Negativ-Kontrolle wurden nicht behandelte ES-Zellen und PCR-negative Klone verwendet. Die Hybridisierung erfolgte mit der externen 5'-Cx26-Sonde (siehe 2.16 und 3.1.2). Der Austausch des Cx26-Gens gegen das klonierte Konstrukt war nur bei dem PCR-positiven Klon erfolgt.



Der Hybridisierungs-Nachweis mit einer internen LacZ-Sonde (siehe 2.16) wurde zum Ausschluss einer Mehrfach-Insertion oder Insertion des LacZ-Gens an einer anderen Stelle des Genoms durchgeführt. Für Klon 140 wurde nur das erwartete 9 kb große Fragment für das Cx26^{LacZn}-Allel nachgewiesen (siehe Anhang).

4.1.4.1.2 Transiente Transfektion

Der positive ES-Zellklon (Klon 140) wurde mit dem pCre-Pac-Vektor transient transfiziert, um die Funktionalität der loxP-Stellen in embryonalen Stammzellen zu gewährleisten. Von 96 Klonen wurden 48 zum β -Galaktosidase-Test und 48 zu einer PCR-Analyse mit den Startermolekülen Cx26_for und Cx32_rev eingesetzt. Das Cx32-Gen konnte anstelle des LacZ-Reportergens amplifiziert und somit die Funktionalität der loxP-Stellen in embryonalen Stammzellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis konnte mit der Southern Blot Analyse (siehe Anhang) verifiziert werden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer externen 5'-Cx26- (siehe 2.16) und internen Cx32- (siehe 2.16) Sonde. Mit der externen 5'-Cx26-Sonde konnte ein 12 kb Fragment für Wildtyp, ein 9 kb Fragment für LacZ und ein 8 kb Fragment im Fall von Cx32 gezeigt werden. Mit der internen Cx32-Sonde konnte wie erwartet nur das 8 kb Fragment für Cx32 nachgewiesen werden.

4.1.4.1.3 Blastozysteninjektion

Der einzige rekombinierte ES-Zell-Klon (Klon 140) wurde mehrfach zur Blastozysteninjektion eingesetzt.

Es wurden insgesamt 6 chimäre Tiere (Anhang) mit einem Chimärismusgrad $\geq 40\%$ gezeugt. Alle sechs Chimären wurden zu Verpaarungszwecken eingesetzt und hatten agouti-farbene Nachkommen. Die Chimären 4 und 6 hatten einen Chimärismusgrad von annähernd 100 % und erzeugten nur agouti-farbene Nachkommen. Diese Tiere vererbten das veränderte Allel an 50 % der Nachkommen.

4.1.5 Erzeugung der Cx26^{26/LacZ}-Mauslinie

Die aus den Chimären-Verpaarungen resultierenden, agouti-farbenen Mäuse wurden nach der Genotypisierung (siehe 3.1.3.1) zur Verpaarung mit C57BL/6-Tieren eingesetzt. Das ausgetauschte Allel wurde nach Mendel zu 50 % an die Nachkommenschaft weiter vererbt. Die Tiere mit dem Cx26^{+/LacZn}-Genotyp wurden mit del-Flp-Mäusen verpaart, um die Neomycin-Kassette (Cx26^{+/LacZ}) zu beseitigen, da diese einen negativen Einfluss auf die Expression haben könnte (MANLEY et al., 2001; BORNSTEIN et al., 2002).

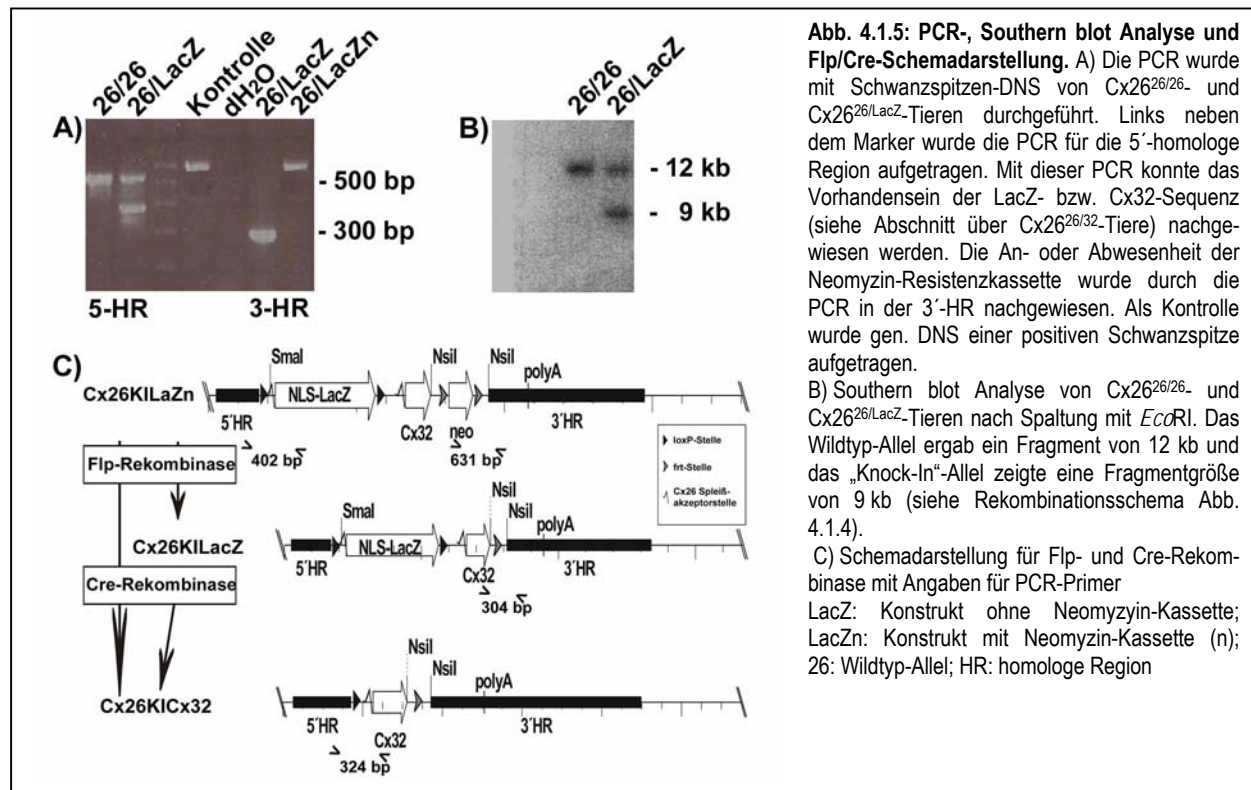
4.1.5.1 Analysen der Cx26^{26/LacZ}-Mauslinie

Die Analysen der erzeugten Mauslinie erfolgten auf DNS-Ebene durch PCR und Southern Blot, auf RNS-Ebene mittels RT-PCR und auf Protein-Ebene anhand der Western blot Analytik. Weitere Experimente, wie z.B. der β -Galaktosidase-Nachweis und Immunfluoreszenzen, wurden an Embryonen und Organen adulter Tiere durchgeführt und was in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.1.5.2 PCR- und Southern Blot Analyse

Die Schwanzspitzen der Nachkommen aus Verpaarungen wurden routinemäßig zur Genotypisierungs-PCR eingesetzt. In Abb. 4.1.5 (A) wurde exemplarisch die PCR für den Nachweis des LacZ-Gens im Cx26-Lokus dargestellt. Der Nachweis des Cx26- (541 bp) bzw. LacZ-Gens (402 bp) erfolgte durch eine Multiplex-PCR in der 5'-homologen Region mit den Startermolekülen Cx26ss-for [1], Cx26ss-rev1 und LacZrev1 [2] (siehe Abb. 4.1.5 (C)).

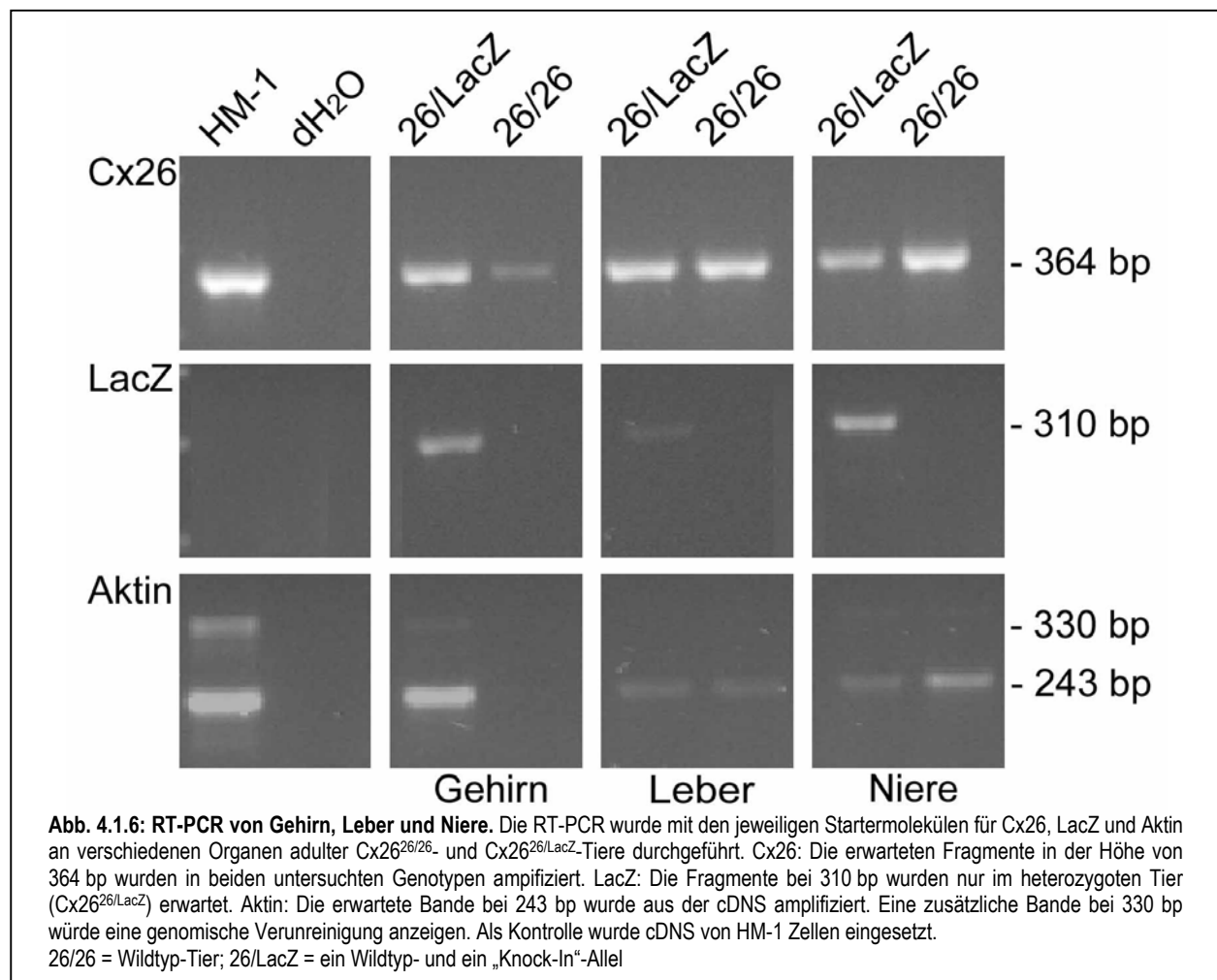
Die An- (26/LacZn; 631 bp) bzw. Abwesenheit (26/LacZ; 304 bp) der Neomycin-Selektionskassette wurde mit den Startermolekülen Cx26ss-rev2 [4], Cx32ss-for [5] und Neo-for [3] in der 3'-homologen Region nachgewiesen. In der schematischen Darstellung zur Verwendung der Flp- und Cre-Rekombinase (Abb. 4.1.5 C) wurden die Startermoleküle und die Fragmentgrößen eingezeichnet.



Der Southern Blot Nachweis erfolgte mit der externen 5'-Sonde für Cx26 an DNS aus Leberpräparaten (siehe 2.16 und 3.1.2). Im Rekombinationsschema (Abb. 4.1.4) wurden sowohl die verwendeten Restriktionsendonukleasen und Sonden eingezeichnet als auch die resultierenden Fragmentgrößen. Die erwarteten Fragmente konnten für das Cx26^{wt}-Allel (12 kb) und das Cx26^{LacZ}-Allel (9 kb) dokumentiert werden (siehe Abb. 4.1.5 B). Die Hybridisierung mit einer internen LacZ-Sonde (siehe 2.16) bestätigte die ermittelten Resultate (Anhang).

4.1.5.3 RT-PCR Analyse

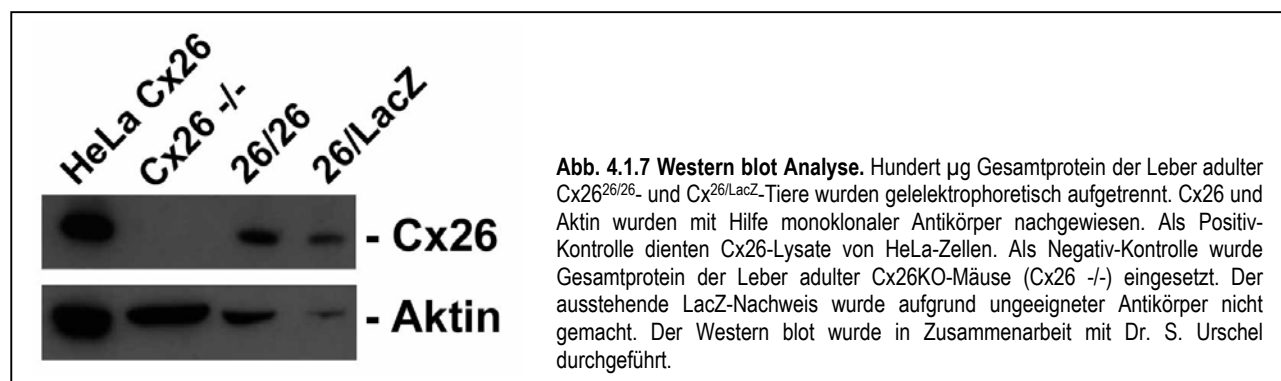
Die RT-PCR (siehe 3.1.4) wurde mit intron-überspannenden Startermolekülen durchgeführt. Die RNS wurde aus den Organen Gehirn, Leber und Niere der Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/LacZ}-Tiere isoliert und in cDNS umgeschrieben, welche zur PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Es wurden die Startermoleküle für den Nachweis des Cx26-, LacZ- und Actin-Gens (siehe 2.15) verwendet.



In Abb. 4.1.6 wurden die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt. Der obere Abschnitt zeigt das Bandenmuster für die Verwendung der Startermoleküle für Cx26. Für beide untersuchten Genotypen konnte die erwartete Bande in Höhe von 364 bp detektiert werden. Im Fall von LacZ (mittlerer Abschnitt) zeigte nur die RT-PCR der cDNS aus Cx26^{26/LacZ}-Tieren die erwartete Bande in Höhe von 310 bp. Die Stärke des Signals für die Cx26^{26/LacZ}-Leber war schwächer ausgeprägt als bei Gehirn und Niere. Mit der Aktin-Kontrolle können Verunreinigungen der cDNS durch genomische DNS detektiert werden, welches zu einem zusätzlichen Fragment bei 330 bp führen würde. Die durchgeführten RT-PCR's mit den Aktin-Startermolekülen zeigten das erwartete Fragment bei 243 bp. Die Intensität der Banden war in den Proben für das Wildtyp-Gehirn, die Wildtyp-Leber und die Cx26^{26/LacZ}-Niere sehr schwach. Die Kontrollen wurden mit HM-1 cDNA durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNS (dH₂O).

4.1.5.4 Western blot Analyse

Die Western blot Analytik wurde in Zusammenarbeit mit Dr. S. Urschel (Institut für Genetik, Universität Bonn) durchgeführt. Hundert µg Gesamtprotein der Leber adulter Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/LacZ}-Tiere wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Immobilisierung der Proteine auf den Filtern wurde der Nachweis für Cx26 und Aktin mit den entsprechenden, monoklonalen Antikörpern (siehe 2.18) durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente Cx26-HeLa-Lysat und als Negativ-Kontrolle wurde Gesamtprotein aus der Leber von Cx26KO-Mäusen (Cx26^{-/-}) verwendet. Der Aktin-Abgleich zeigte, dass im Fall der Cx26^{26/LacZ}-Leber eine geringere Menge Gesamtprotein eingesetzt wurde. Daher konnte der erwartete Nachweis der Cx26 Proteinmenge in Cx26^{26/LacZ} Lebern nicht gezeigt werden (Abb. 4.1.7).



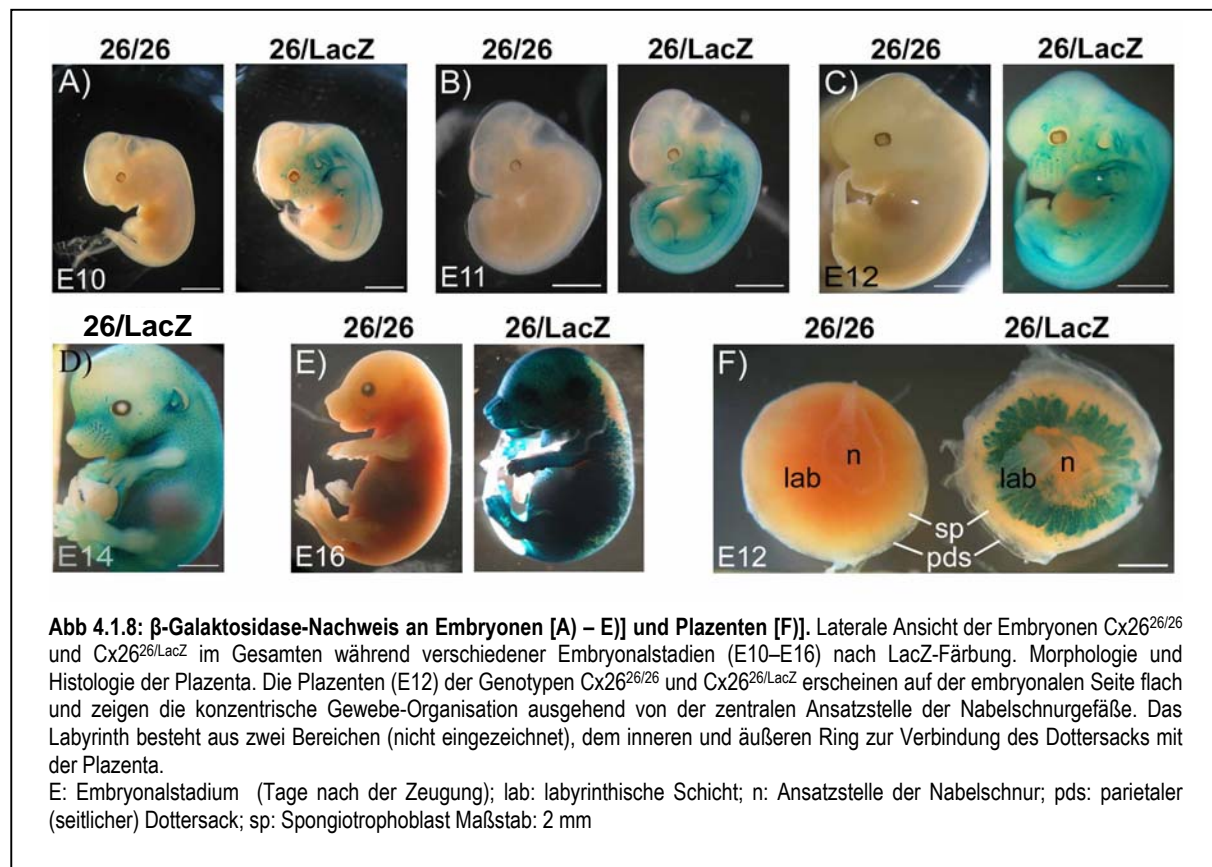
4.1.5.5 β-Galaktosidase-Nachweis an Cx26^{26/LacZ}-Embryonen

Für den LacZ-Nachweis an Cx26^{26/LacZ}-Embryonen wurden verschiedene Embryonalstadien (E10–E16) präpariert. Die Embryonen wurden in lateraler Ansicht in Abbildung 4.1.8 dargestellt. Die Wildtyp (Cx26^{26/26})

Embryonen (links) zeigen im Vergleich zu den heterozygoten ($Cx26^{26/LacZ}$) Embryonen (rechts) keine sichtbaren LacZ-Färbungen. Früherer Stadien (E9) wurden präpariert, aber in der vorliegenden Abbildung nicht berücksichtigt, da keine LacZ-Färbung zu erkennen war.

In der Haut wurde eine leichte LacZ-Expression ab Embryonalstadium E10 nachgewiesen, die, mit zunehmendem Alter der Embryonen, im Bereich des Haarschafts sowie der Barthaare intensiver wurde. Eine Blaufärbung der Hornhaut (Cornea) des Auges sowie im Bereich des Ohrs konnte ab Embryonalstadium E10 in $Cx26^{26/LacZ}$ -Tieren gezeigt werden. An Gesamt-Embryonen konnte im Bereich des Gehirns, während der Embryonalentwicklung, keine LacZ-Expression nachgewiesen werden.

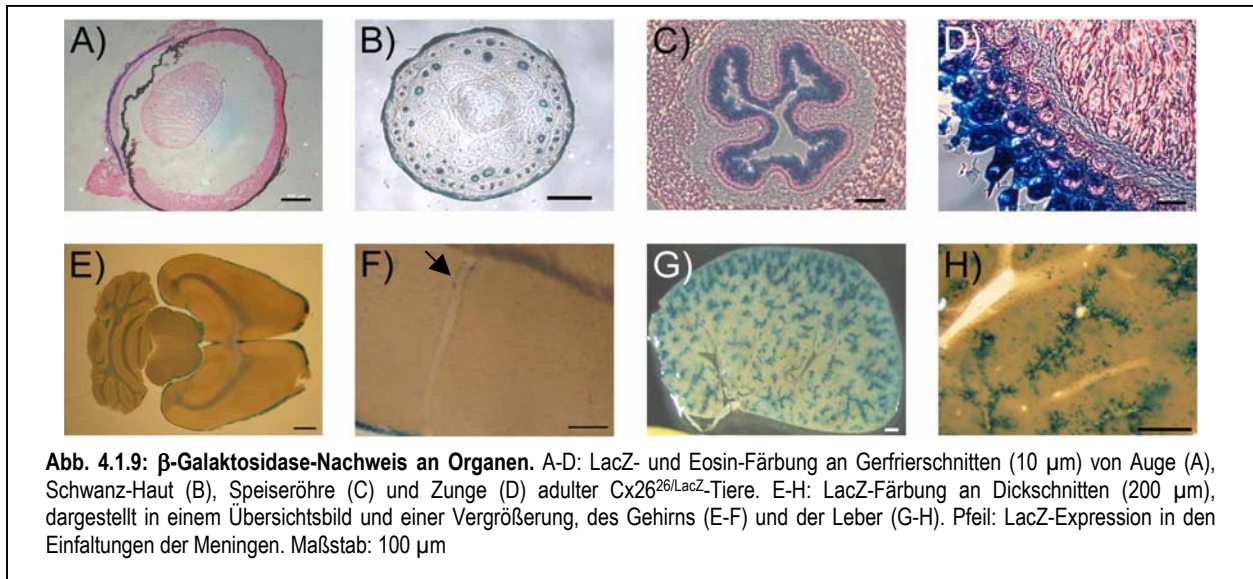
Der β -Galaktosidase-Nachweis wurde exemplarisch an der Plazenta eines $Cx26^{26/26}$ - und eines $Cx26^{26/LacZ}$ -Embryos (E12) dargestellt. Die Plazenten lagen mit der embryonalen Seite nach oben. Diese Seite erschien flach und zeigte die konzentrische Gewebe-Organisation ausgehend von der zentralen Ansatzstelle der Nabelschnurgefäße. Im heterozygoten Embryo konnte eine LacZ-Expression in der labyrinthischen Schicht beobachtet werden, wobei der äußere Ring eine intensivere Färbung aufwies. Wildtyp-Plazenten zeigten keine LacZ-Expression.



4.1.5.6 β -Galaktosidase-Nachweis an Organen

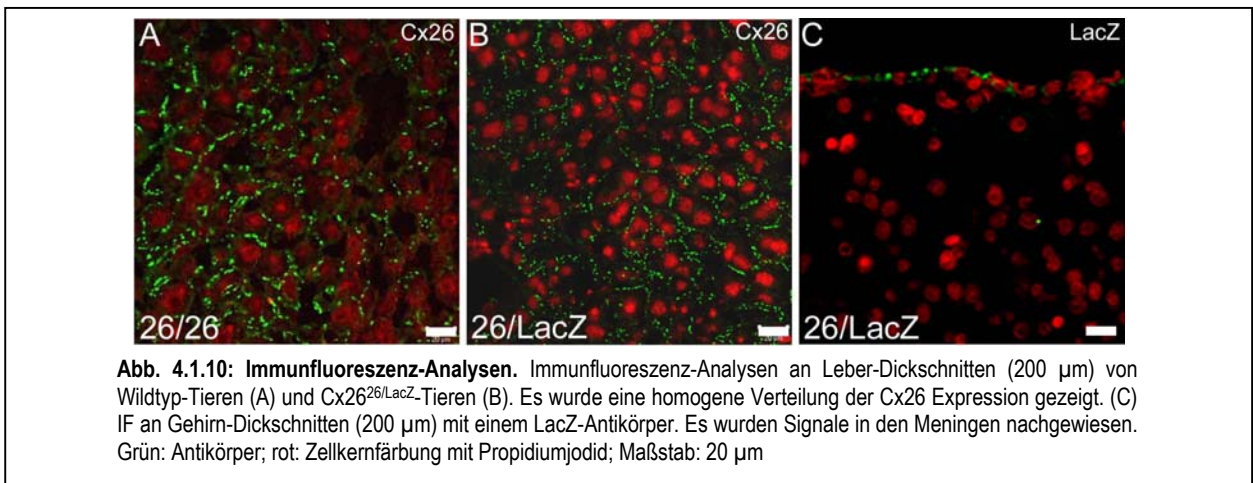
Der Nachweis wurde an verschiedenen Organen von Cx26^{26/LacZ}-Tieren durchgeführt. Folgende Organe wurden präpariert: Auge*, Darm(*), Gehirn*, Haut* (Schwanzspitze), Herz, Leber*, Lunge, Magen(*), Milz, Niere(*), Pankreas, Speiseröhre*, Testis* und Zunge*, um einen kompletten Überblick über die Cx26-Expression zu erhalten. Die mit * gekennzeichneten Organe zeigten eine eindeutige LacZ-Färbung (Abb. 4.1.9). Bei Darm und Magen wurde eine LacZ-Färbung sowohl in Cx26²⁶- als auch in Cx26^{LacZ}-Tieren nachgewiesen, was auf eine „Kreuzreaktivität“ hinweist. In der Niere konnte eine Blaufärbung vereinzelter Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bild A) zeigte einen Querschnitt durch den Augapfel. Die LacZ-Färbung im Bereich der Cornea (Hornhaut) ist offensichtlich. Für den Nachweis der Expression in der Haut wurden exemplarisch Querschnitte des Schwanz (B) hergestellt. Das Verteilungsmuster reduzierte sich in adulten Tieren auf die, den Haarschaft umgebenden, Keratinozyten. In der Speiseröhre (Bild C) beschränkte sich die Expression auf die Lamina epithelialis mucosae und in der Zunge (D) auf die Papilla filiformis. In den Kontrollen konnten keine Färbungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Sowohl in den Gefrierschnitten (10-20 μ m) (Daten nicht gezeigt) als auch in den Dickschnitten (200 μ m) (E-F) vom Gehirn konnte eine eindeutige LacZ-Färbung nur in den Meningen gezeigt werden. Eine starke Vergrößerung des Gehirn-Dickschnittes (F) zeigte Einfaltungen (siehe Pfeil) der Hirnhaut (Meningen), die blau angefärbt waren. Die Leberschnitte (G-H) zeigten eine Heterogenität (regionale Verteilung von periportal zu perizentralen Bereichen). Weitere Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Gebhardt (Universität für Biochemie; Universität Leipzig) an Leber-Gefrierschnitten (10-20 μ m) durchgeführt. Doppelfärbungen, für LacZ und Glutaminsynthetase (GS), an Lebern von zwei Cx26^{26/LacZ}-Tieren ergaben, im Vergleich der beiden Tiere, Abweichungen in der regionalen Verteilung (Heterogenität). Die Glutaminsynthetase wird in den periportal Arealen der Leber exprimiert und für den Nachweis der zonalen Verteilung eingesetzt. In Tier 1 (4 Woche alt) konnte eine eindeutige zonale Verteilung zugunsten des periportal Arealen beobachtet werden, wohingegen im Tier 2 (8 Wochen alt) die Heterogenität wesentlich schwächer ausgeprägt war, was eventuell auf das unterschiedliche Alter der beiden Tiere zurückzuführen war. Leberschnitte (5 μ m, 10 μ m und 20 μ m) von Geschwister-Tieren (vier Monate alt) mit den Genotypen Cx26^{26/26}, Cx26^{26/lacZn} und Cx26^{26/lacZ} wurden analysiert. Die Heterogenität im Cx26^{26/LacZ}-Tier war deutlich schwächer als bei den zuvor beschriebenen Tieren, ausgeprägt ebenso bei dem Cx26^{26/LacZn}-Tier. Die Ergebnisse der LacZ-Expression in Gehirn und Leber sollten durch Immunfluoreszenz-Analysen (siehe 4.1.5.7) gesichert werden.



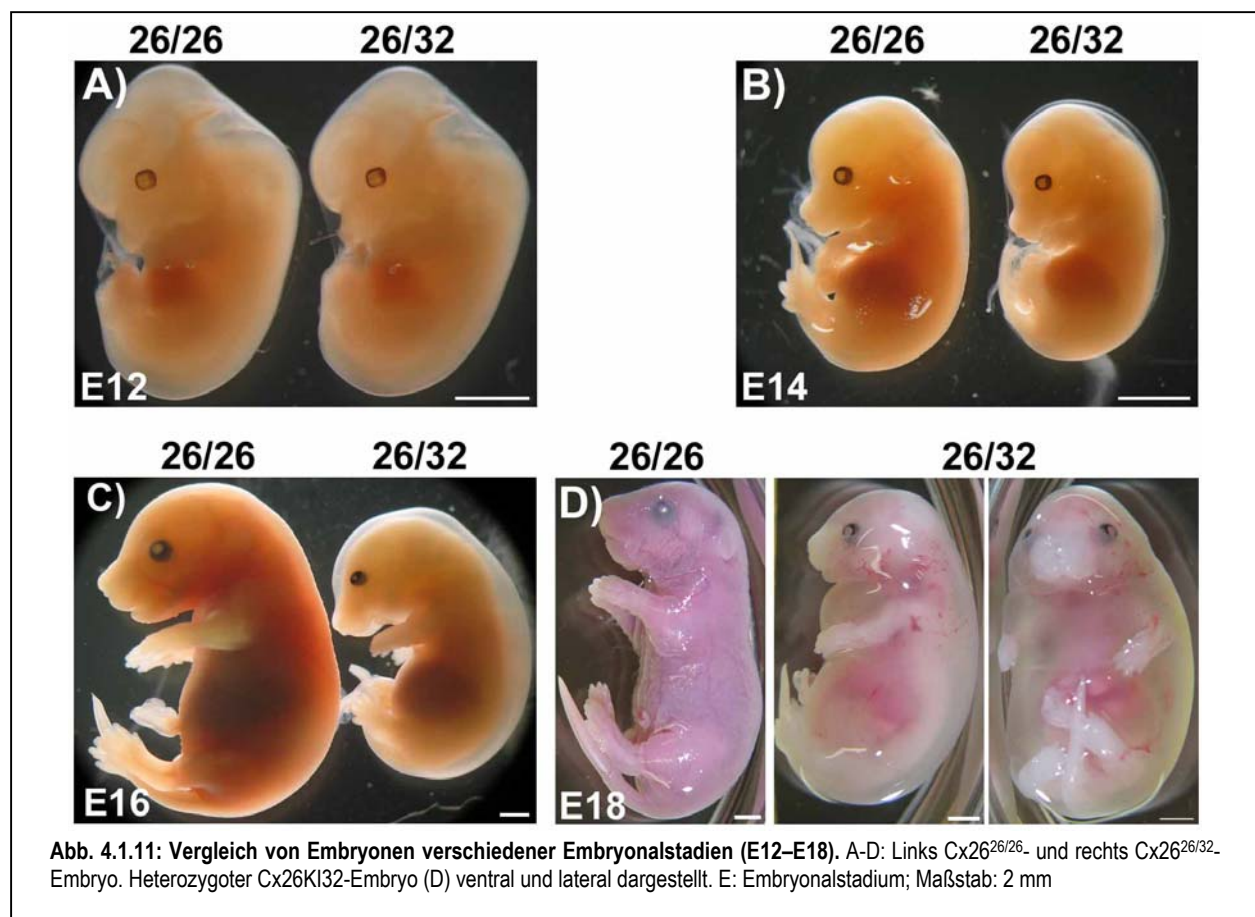
4.1.5.7 Immunfluoreszenz-Analysen an Gehirn und Leber

Die Bestätigung der LacZ-Expressionsdaten wurde mittels der Immunfluoreszenz-Analyse angestrebt. An Gefrier- (10 μm) und Dickschnitten (200 μm) von Gehirn und Leber wurden sowohl LacZ-Färbungen als auch Antikörper-Nachweise (Cx26 und LacZ) durchgeführt.



In den Meningen (Hirnhaut) der Gehirnschnitte konnten mit Cx26-Antikörpern (anti-rabbit) Signale nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), welche an Dickschnitten (200 μm) mit dem LacZ-Antikörper (siehe 4.1.10) bestätigt werden konnten. Antikörperreaktionen in anderen Gehirnregionen, wie z.B. Astrozyten-reichen Regionen, wurden nicht nachgewiesen.

Gegensatz zu den beiden anderen wirkte Embryo 1 sehr klein und unterentwickelt, wobei man Ansätze von Blutgefäßen erkennen konnte. Bei anderen Embryonen konnte man anstelle dessen leichte bis starke Einblutungen ins Gewebe feststellen. Das Fehlen eines Unterkiefers (Agnathie; Embryo 2) war ein häufig auftretender Phänotyp. Embryo 3 hatte große Hämatome (Einblutungen), sowie eine ausgeprägte, ödemartige Schwellung unter der Haut. Die Augen der Cx26^{26/32}-Embryonen wirkten im Allgemeinen offen, wobei sie von der Schwellung überlagert schienen. Die Augen der Wildtyp-Geschwister währenddessen schienen bis zur Geburt geschlossen zu sein. Eine Beeinträchtigung der äußeren Entwicklung des Ohrs im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen konnte festgestellt werden.



Bei der Präparation von Cx26^{26/32}-Embryonen (Abb. 4.1.13) stellte sich heraus, dass die Haut bzw. das Gewebe sehr „schwammig“ und schlecht zu greifen war. Der Eindruck von Wassereinlagerungen (Ödeme) unter der Haut verstärkte sich. Die Knochenstruktur war sehr fragil. In der Ausbildung der inneren Organe konnten, wie schon bei der äußeren Entwicklung, starke Variationen beobachtet werden. Die Leber (Abb. 4.1.13 B u. E) war gut durchblutet und makroskopisch normal entwickelt. Die anderen Organe des

Der Einsatz der polyklonalen Cx26-Antikörper (anti-rabbit) in der Leber zeigte im Gegensatz zu den LacZ-Daten keine heterogene, sondern eine homogene Verteilung im Leber-Gefrierschnitt (siehe 4.1.10).

4.1.6 Erzeugung der Cx26^{26/32}-Mauslinie

Der Austauschvektor (Abb. 4.1.1) wurde so konzipiert, dass zuerst eine Reporter-gen-Analyse im Cx26 Genort stattfinden konnte (siehe 4.1.5) und nach entsprechender Verpaarung mit Cre-Mäusen ein Austausch des Cx26-Gens durch das Cx32-Gen vorlag (Abb. 4.1.4). Die Ergebnisse dieses Austausches wurden im Folgenden aufgeführt.

4.1.6.1 Analyse der Cx26^{26/32}-Mauslinie

Cx26^{26/32}-Tieren waren nicht lebensfähig, was sich durch Verpaarungen mit Cre-Tieren zeigte. Die Embryonen von Cre-Weibchen wurden entweder im Mutter-Tier resorbiert oder sie blockierten am Ende der Schwangerschaft den Geburtskanal, was zum Tod des Muttertiers führte. Ein ähnliches Phänomen konnte bei heterozygoten Cx26^{lacZ}-Weibchen nicht beobachtet werden. Die heterozygoten Weibchen brachten nach Verpaarung mit Cre-Männchen Nachkommen zur Welt, die ausnahmslos die Genotypen Cx26^{26/26}- oder Cx26^{26/LacZ} hatten (8 Verpaarungen mit insgesamt 50 Nachkommen). Embryonenpräparationen wurden vorgenommen, um das Vorhandensein und Absterben der Cx26^{26/32}-Embryonen abzuklären.

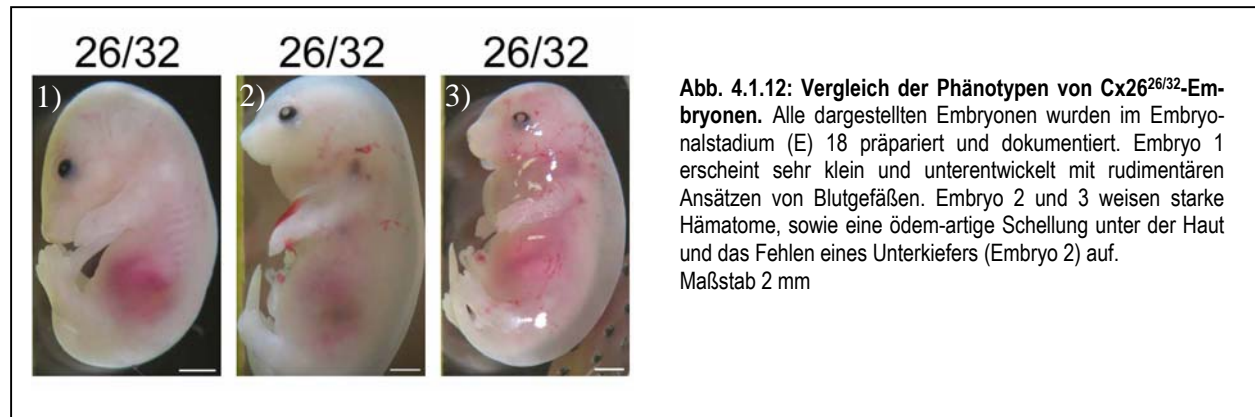
4.1.6.2 Präparation und Analyse von Cx26^{26/32}-Embryonen

Es wurde zunächst von der Annahme ausgegangen, dass die Cx26^{26/32}- wie die Cx26^{-/-}-Embryonen im frühen Embryonalstadium (E10), aufgrund eines Plazentadefekts, sterben (GABRIEL et al., 2000). Alle drei erwarteten Genotypen - Cx26^{26/26}, Cx26^{26/LacZ} und Cx26^{26/32} – konnten mittels PCR (siehe 3.1.3) nachgewiesen und keine morphologischen Auffälligkeiten der Cx26^{26/32}-Embryonen beschrieben werden.

Zur Beantwortung der Frage wann die Cx26^{26/32}-Embryonen starben, wurden Embryonen verschiedener Embryonalstadien (E10–E18) präpariert und in Abb. 4.1.11 im Vergleich - links Wildtyp-Embryo zu rechts Cx26^{26/32}-Embryo - dokumentiert. Außerdem konnte ein Wurf beobachtet werden, bei dem ein Neugeborenes (P0) des Genotyps Cx26^{26/32} tot, mitsamt Plazenta und umgeben von der äußeren Embryonalhülle, geboren wurde.

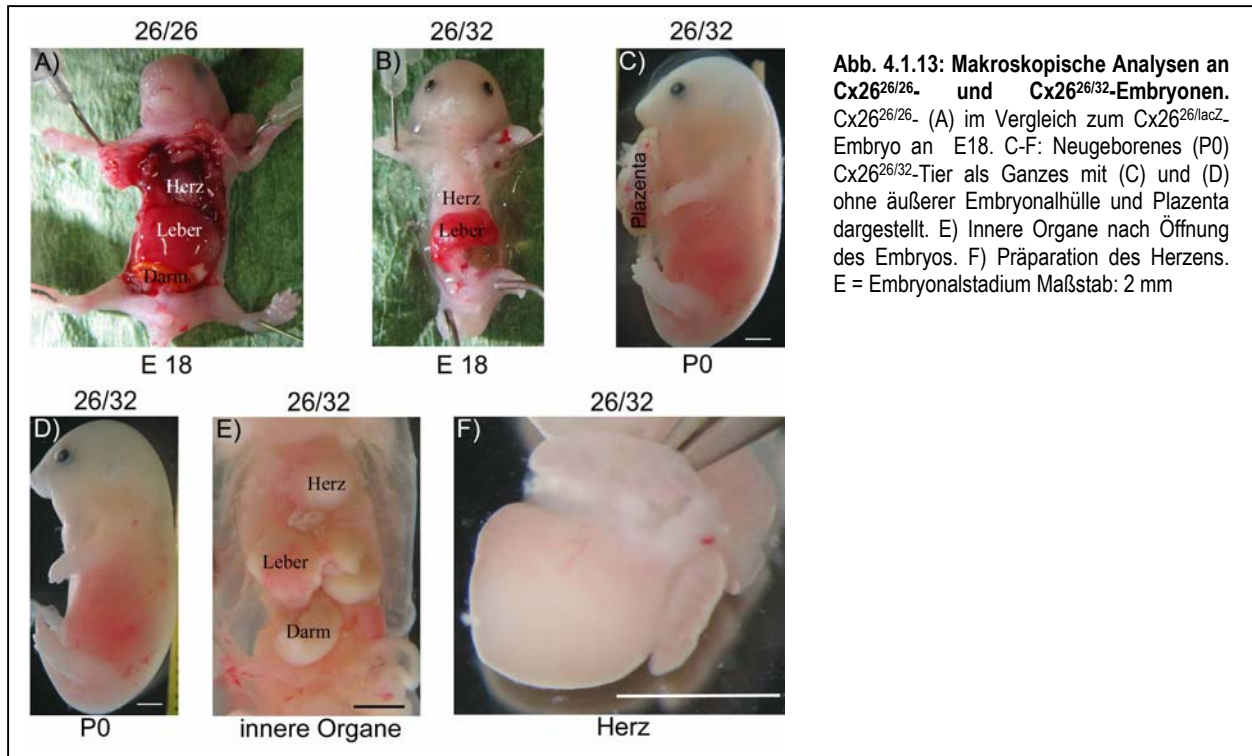
Die Cx26^{26/32}-Embryonen konnten mit zunehmenden Alter (\geq E16) schon am äußeren Erscheinungsbild erkannt werden. Die Haut wirkte blaß, durchscheinend und schlecht durchblutet. Eine mehr oder minder starke, ödem-artige Schwellung (ab E14) wurde unter der Haut beobachtet. Die äußeren, phänotypischen Auswirkungen waren ansonsten sehr unterschiedlich. Embryonen des gleichen Embryonalstadiums (E18; Abb. 4.1.12) zeigten ausgeprägte Unterschiede im Entwicklungsstadium und äußeren Erscheinungsbild. Im

Bauchraums wie Darm, Niere, Magen und Milz konnten nicht bei allen präparierten Embryonen beobachtet werden. Im Brustraum konnte makroskopisch das Herz, aber keine Lunge gezeigt werden. Das Herz wies keinerlei Durchblutung (Abb. 4.1.13 F) auf, allerdings konnte eine schwache Kontraktion des Herzmuskels erfasst werden.



Insgesamt wurden 106 Embryonen verschiedener Embryonalstadien (E10-E18) präpariert und genotypisiert. 51 Embryonen wiesen den Wildtyp-Lokus und 55 einen mutierten Cx26-Lokus auf, die wiederum in 30 Embryonen mit Cx26^{26/LacZ}-Genotyp und 25 mit Cx26^{26/32}-Genotyp unterteilt werden konnten. Dies entsprach dem Mendelschen Verhältnis.

Zur Erfassung eventueller Gewichtsschwankungen wurden Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/32}-Embryonen (E18) und deren Plazenten nach der Präparation gewogen (n = 11 je Genotyp). Die Cx26^{26/26}-Embryonen (1,6 g ± 0,055) waren doppelt so schwer wie die Cx26^{26/32}-Embryonen (0,8 g ± 0,225) und somit konnte eine Signifikanz von 8,07⁻¹⁰ ermittelt werden. Die Gewichte der Plazenten zeigten keine Auffälligkeiten. Im Vergleich zu den E18-Embryonen zeigten Embryonen im Embryonalstadium E12 noch keine Unterschiede im Gewicht.



4.1.6.3 Paraffinschnitte der Cx26^{26/32}-Embryonen

Die histologischen Paraffinschnitte (7 µm; Abb. 4.1.14) von Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/32}-Embryonen (E17) wurden im Labor von Prof. Dr. E. Winterhager (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) angefertigt. Die Cx26^{wt}-Embryonen (A; D und G) gaben eine Übersicht über Morphologie und Lage der Organe im Brustraum (A) wieder. Im Vergleich dazu zeigte sich in den Cx26^{26/32}-Embryonen (B, C), dass die Lunge nur rudimentär entwickelt war. In Serienschnitten konnte bei einigen Embryonen keine Lungenentwicklung beobachtet werden. Bei starker Vergrößerung des Lungengewebes (G) ließen sich ein sehr kompaktes Gewebe ohne erkennbare Ausdehnung des luftzuführenden Systems, wie Alveolargänge und -bläschen, erkennen. Das Herz war zwar dilatiert, zeigte aber eine vollständige Kammerung mit Vorhöfen und rechter und linker Herzkammer. Durch die rudimentäre Ausbildung der Lungen war die Brusthöhle nicht ausgefüllt. Sie wurde durch das Zwerchfell von der Bauchhöhle getrennt.

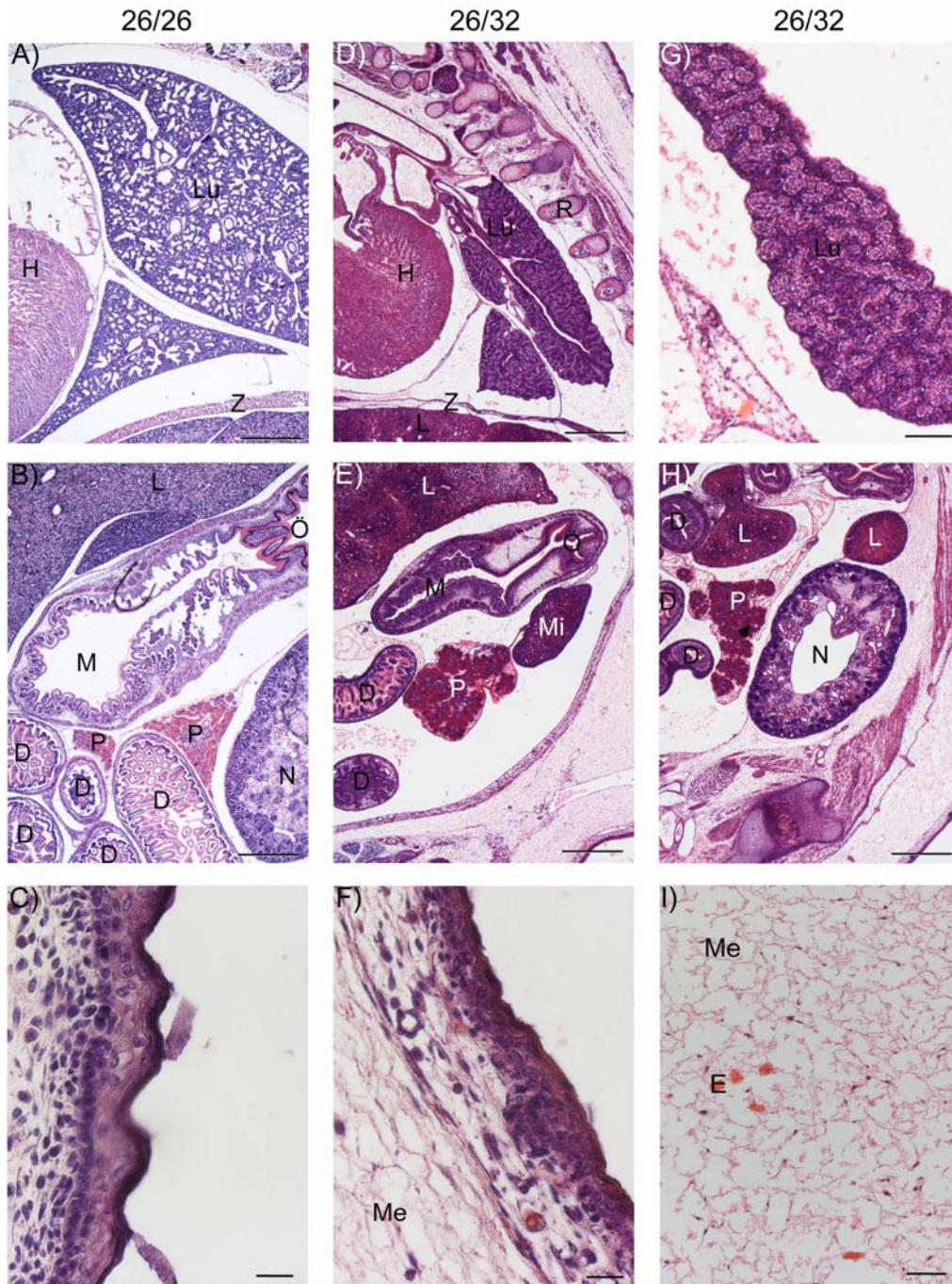


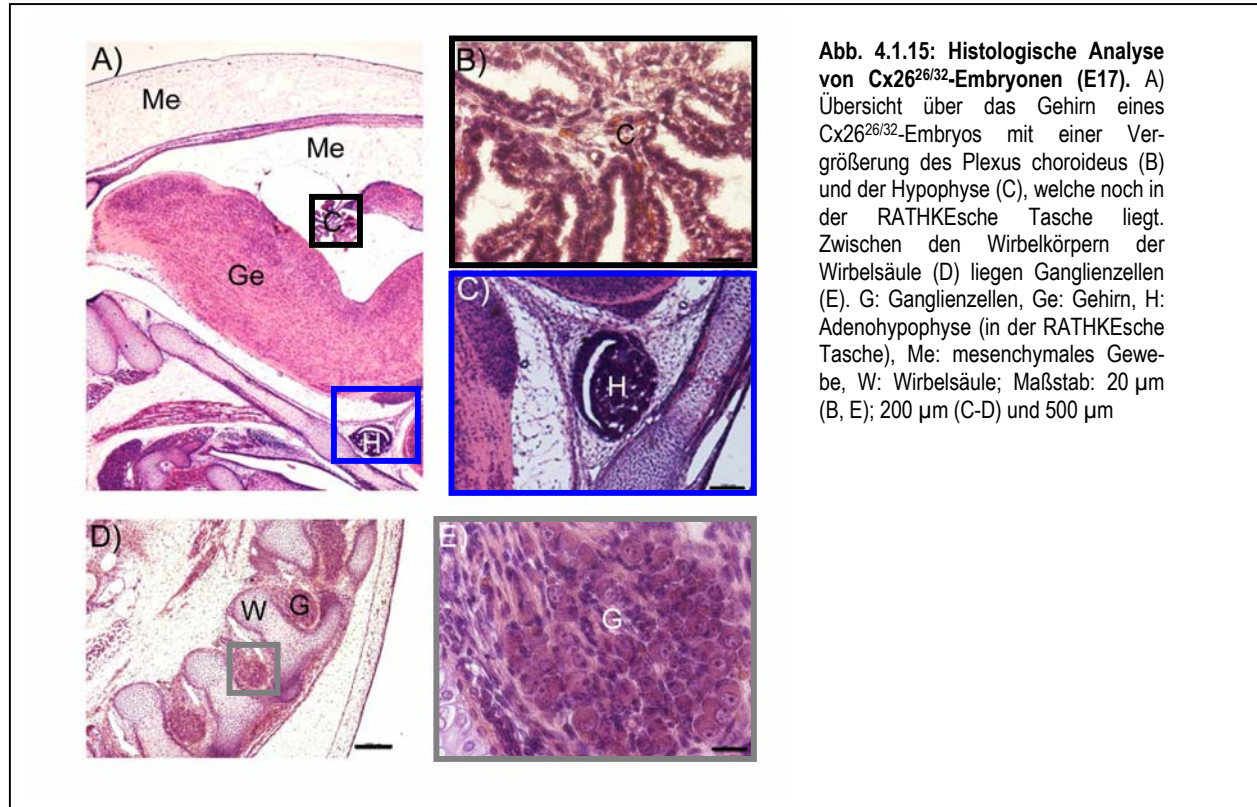
Abb. 4.1.14: Histologische Analyse von Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/32}-Embryonen (E17). Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte (7 µm) an Cx26^{26/26}-Embryonen (A-C) und Cx26^{26/32}-Embryonen (D-I). Übersicht der Organe des Brustraums (A, D), mit Herz und Lunge. Die starke Vergrößerung der Lunge (G) eines Cx26^{26/32}-Embryos zeigte ein sehr kompaktes Gewebe ohne erkennbare Alveolargänge und -bläschen. Die inneren Organe, wie Dünndarm, Leber, Magen, Milz, Niere und Pankreas der Bauchhöhle (B, E, H) wiesen eine völlige Desorganisation im Vergleich zum Wildtyp-Embryo (B) auf. Die Epidermis und Dermis des Wildtyp-Embryos (C) zeigten im Vergleich zum Cx26^{26/32}-Embryo zwar einen typischen Aufbau, aber das subkutane Bindegewebe hatte noch mesenchymalen Charakter (F, I). D: Dünndarm, E: Erythrozyten, H: Herz, L: Leber, Lu: Lunge, M: Magen, Mi: Milz, Me: mesenchymale Gewebe, N: Niere, Ö: Ösophagus, R: Rippen, Z: Zwerchfell. Maßstab: 20 µm (C, F, I); 100 µm (G); 500 µm

Die inneren Organe der Bauchhöhle (B, E und H) zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen (B) ebenfalls eine völlige Desorganisation und rudimentäre Ausbildung. Im Vergleich zur Leber des Cx26^{26/26}-Embryos zeigte die Leber der Cx26^{26/32}-Embryonen nekrotische Veränderungen. Der gesamte Magen-Darm-Trakt wies keine voll ausdifferenzierte, typische Struktur auf, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Insbesondere die Mukosa des Darmes war in vielen Bereichen kaum differenziert und die dadurch entstehenden, typischen differentialdiagnostisch wichtigen Unterschiede im Bereich des Dün- und Dickdarms konnten nicht erkannt werden. Entsprechend der reduzierten Differenzierung aller Bauchhöhlenorgane war die Bauchhöhle nicht von den Organen eingenommen, sondern erstaunlicherweise von einem vermutlich mesenchymalen Bindegewebe ausgefüllt.

Andere Bauchorgane, wie Niere, Pankreas und Urogenitaltrakt, waren zwar in der Anlage vorhanden, aber auch die Niere und der Pankreas zeigten sich als nicht voll ausdifferenziertes Gewebe.

Die Epidermis und Dermis des Cx26^{26/26}-Embryos (C) zeigte im Vergleich zum Cx26^{26/32}-Embryo zwar den typischen Aufbau, war aber weit weniger ausdifferenziert. Auch hier zeigte sich im Vergleich, dass das subkutane Bindegewebe zumeist noch mesenchymalen Charakter hatte, worauf eine Retardierung der Differenzierung hinweist. Das mesenchymale embryonale Bindegewebe besteht aus zytoplasmaarmen Zellen, die mit ihren teils dünnen, teils flächenhaft ausgebreiteten, stets verzweigten Ausläufern miteinander in Verbindung stehen. Dadurch entsteht ein lockeres dreidimensionales Schwammwerk, dessen Lücken von einer viskösen Interzellulärsubstanz, die vor allem das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure enthält, ausgefüllt sind. Aus dem Mesenchym gehen alle Binde- und Stützgewebe und große Teile der glatten Muskelzellen hervor.

In Abb. 4.1.15 wurden das Gehirn (A-C) und die Wirbelsäule (D-E) dargestellt. Wie schon für Bauchraum und Haut beschrieben, konnte auch im Gehirn mesenchymales Gewebe beobachtet werden. Das Gehirn wirkte in einigen Bereichen undifferenziert. Die Vergrößerung des Bereichs der Hypophyse (C) zeigte, dass die Entwicklung der Adenohypophyse erfolgte, indem unmittelbar vor der Buccopharyngealmembran im Dach der Mundbucht eine nach oben gerichtete Ausstülpung des Epithels auftrat. Diese als Hypophysentasche oder Rathkesche Tasche bezeichnete Ausstülpung wurde in dem vorliegenden Fall jedoch nicht wieder kleiner, sondern entwickelte sich nicht weiter. Das umgebende Mesenchym blieb bestehen. Eine Ausbuchtung des Ventrikelbodens, welche bei der Entwicklung der Neurohypophyse beschrieben wird, konnte nicht beobachtet werden. Die Vergrößerung des Plexus choroideus (B) zeigte eine normale Morphologie. In Bild D) wurde ein Abschnitt der Wirbelsäule gezeigt. Zwischen den Wirbelkörpern konnten in einer Vergrößerung Ganglienzellen (E) dargestellt werden.



4.2 Das Projekt: Cx43KI26

4.2.1 Mäuse mit gezieltem Ersatz der Cx43-kodierenden DNS durch Cx26-kodierende DNS

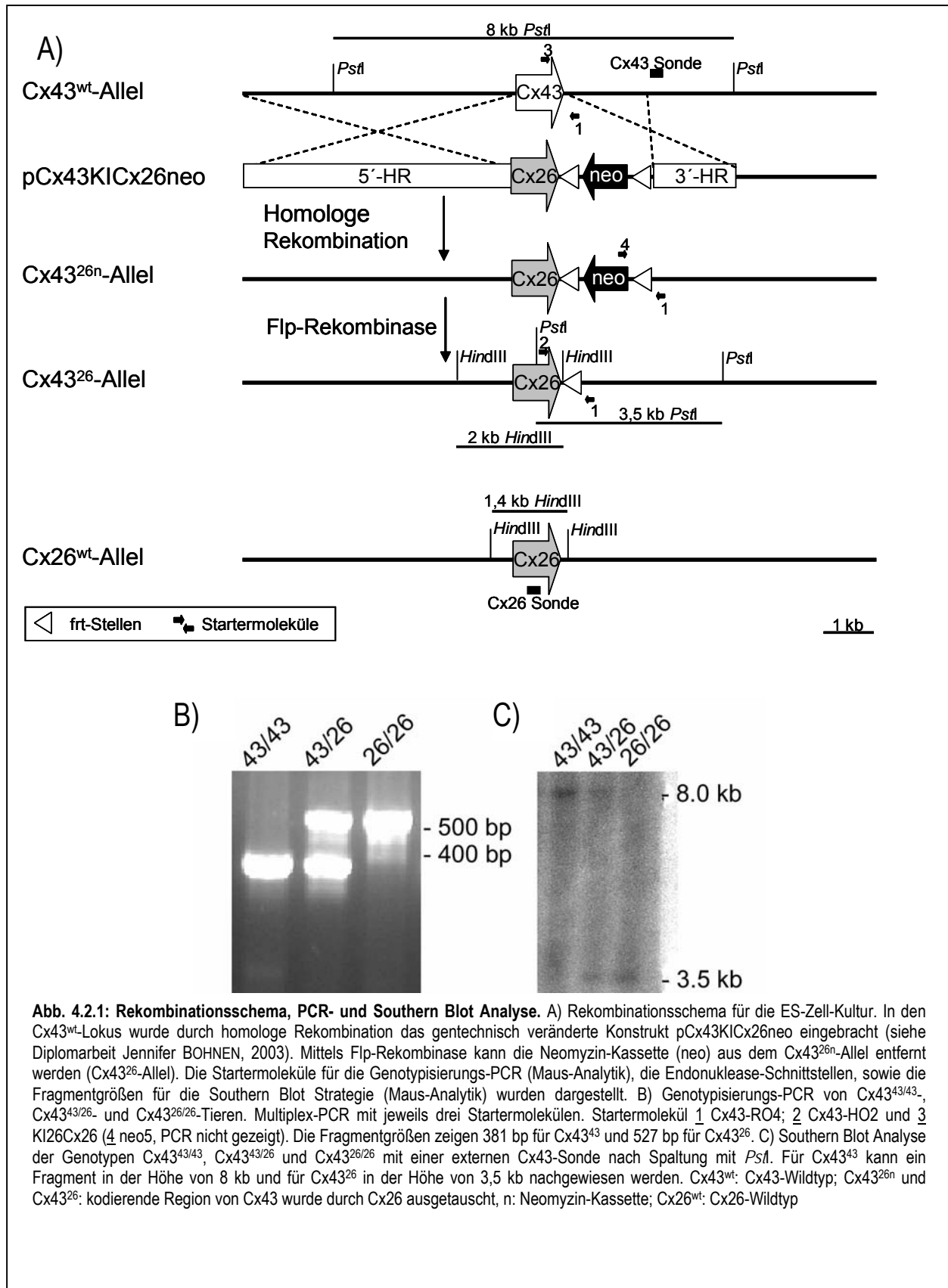
Zur Untersuchung funktioneller Spezialisierung und Redundanz unter den einzelnen Mitgliedern der Connexin-Familie in vivo wurden Mäuse mit einem gezielten Ersatz der kodierenden Region des Connexin43-Gens durch die kodierende Region des Connexin26-Gens hergestellt. Die Klonierung des Austauschvektors pCx43KI26 (KI = „Knock-In“), die Erzeugung von Stammzell-Klonen mit gezielt mutiertem Connexin43-Lokus und die Herstellung der transgenen Cx43-„Knock-In“-Mauslinie durch Blastozysteninjektion wurden während der Diplomarbeit von Jennifer BOHNEN (2003) durchgeführt und ausführlich beschrieben. Heterozygot ($Cx43^{43/26}$) und homozygot ($Cx43^{26/26}$) mutierte Mäuse wurden in den phänotypischen Veränderungen mit Wildtyp- ($Cx43^{43/43}$), Connexin43-defizienten ($Cx43^{-/-}$ REAUME et al., 1995), Cx43KI40- und mit Cx43KI32- (PLUM et al., 2000) Mäusen verglichen.

Zum besseren Verständnis der Klonierungs-, PCR-, Southern blot- und Verpaarungsstrategie wurde hier noch einmal das zugrunde liegende Rekombinationsschema (Abb. 4.2.1) mit den Merkmalen, die insbesondere für die Maus-Zucht relevant sind, aufgegriffen.

4.2.2 Heterozygot und homozygot mutierte Mäuse sind lebensfähig und exprimieren das eingebrachte Connexin ektopisch

4.2.2.1 Erzeugung und Überprüfung transgener Mäuse mit mutierten Cx43-Allelen

Chimäre Nachkommen wurden zu Verpaarungszwecken mit C57BL/6-Tieren eingesetzt; Keimbahntransmission lag dann vor, wenn Nachkommen einer Chimäre ein agouti-farbenes Fell besaßen. Durch Verpaarung heterozygoter $Cx43^{43/26n}$ -Tiere mit deleter-Flp-Mäusen (exprimieren die Flp-Rekombinase ubiquitär), konnte bei 25 % der Nachkommen die PGK-Neomycin-Selektionskassette genomisch deletiert werden ($Cx43KICx26$; siehe Abb. 4.2.1). Die starke Promotersequenz der Selektionskassette könnte einen negativen Einfluss auf andere Genabschnitte ausüben (MANLEY et al., 2001; BORNSTEIN et al., 2002).



4.2.2.2 Genomische Analyse der Cx43KICx26-Mauslinie

Mit Hilfe einer bestehenden PCR-Analytik (BOHNEN, 2003) wurden die Genotypen Cx43^{43/43}-, Cx43^{43/26} und Cx43^{26/26}-Tiere mit und ohne Selektionskassette unterschieden. Durch eine Multiplex-PCR (Abb 4.2.1) mit jeweils drei Startermolekülen (siehe 2.15) Cx43-HO2 [2], Cx43-RO4 [1] und neo5 [4] bzw. KI26Cx26 [3] wurde das Cx43^{wt}- (381 bp) als auch das Cx43²⁶-Allel mit (neo5; 527 bp) bzw. ohne (KI26Cx26; 527 bp) Neomycin-Selektionskassette amplifiziert.

Die Southern Blot Analysen (Abb. 4.2.1) ergaben die erwarteten Fragmente für die jeweiligen Genotypen, sowohl mit einer externen Cx43-Sonde als auch mit der internen Cx26-Sonde (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.3 RT-PCR Analysen für Cx43 und Cx26

Intron-überspannende RT-PCR Analysen (Abb. 4.2.2) ermöglichten den Nachweis gespleißter Isoformen, welche von den verschiedenen Cx43-Allelen transkribiert wurden. Die mRNA wurde in cDNS umgeschrieben (siehe 3.1.4) und PCR-Reaktionen mit den Startermolekülen für β -Aktin, Cx43 und Cx26 durchgeführt (siehe 3.1.3.2). Die Amplifizierung von β -Aktin diente dem anfänglichen Nachweis einer einheitlichen Effizienz der cDNS-Synthese, sowie des Ausschlusses von Kontaminationen durch genomische DNS. Es entstand ein Amplikon von 243 bp, wenn β -Aktin cDNS als Vorlage diente. Lag hingegen genomische DNS des β -Aktin Gens als Kontamination vor, entstand ein Amplikon von 330 bp, welches ein Intron von 87 bp enthält.

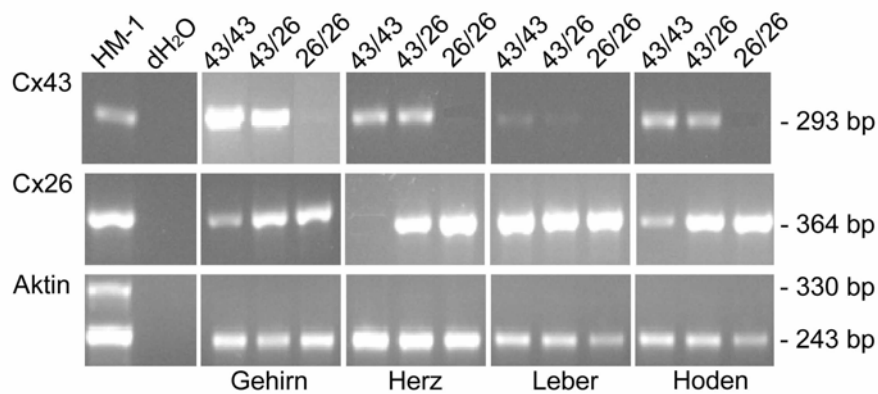


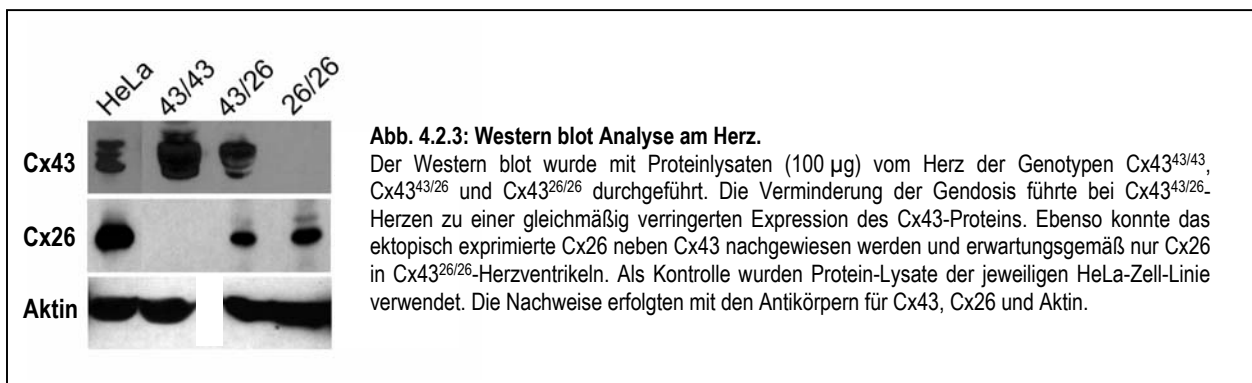
Abb. 4.2.2: RT-PCR von Gehirn, Herz, Leber und Hoden. Die RT-PCR wurde mit den jeweiligen Startermolekülen für Cx43, Cx26 und Aktin an verschiedenen Organen adulter Cx43^{43/43}, Cx43^{43/26} und Cx43^{26/26}-Tieren durchgeführt. Cx43: Das Fragment in Höhe von 293 bp wurde in den Organen der Cx43^{wt}- und Cx43^{43/26}-Tiere nachgewiesen. Cx26: Analog zu Cx43 konnte das Fragment in Höhe von 364 bp in den Organen der Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-Tiere wie erwartet gezeigt werden. Durch die endogene Expression konnte das Fragment zusätzlich in einigen Organen der Cx43^{43/43}-Tiere, außer Herz, ermittelt werden. Aktin: In der Aktin-Kontrolle konnte nur in der Kontrolle eine Bande bei 330 bp gezeigt werden. Diese Bande würde eine genomische Verunreinigung anzeigen. Die Bande in der Höhe von 243 bp zeigte das zu amplifizierende Fragment für Aktin von cDNS. Als Kontrolle dient cDNS aus HM-1 Zellen.

Die Startermoleküle für die Amplifizierung von Cx43 und Cx26 wurden so gewählt, dass ein Intron-überspannendes PCR-Produkt entsteht. Somit war zusätzlich eine Unterscheidung zwischen PCR-Produkten, möglich die durch Amplifizierung der cDNS entstanden sind. Bei der Amplifizierung von Cx43 cDNS entstand ein 293 bp großes, der gesamten, gespleißten kodierenden Region des Cx43 entsprechendes Amplikon. Bei der Amplifizierung von Cx26 cDNS entstand ein 364 bp großes, der gesamten, gespleißten kodierenden Region des Cx26 entsprechendes Amplikon.

Die RT-PCR-Analysen (Abb. 4.2.2) an verschiedenen Organen – Gehirn, Herz, Leber und Hoden - zeigten die erwarteten Signale für β -Aktin (243 bp) mit nahezu identischer Intensität, jedoch keine Bande in der Höhe von 330 bp, für Cx43 (293 bp) und analog für Cx26 (364 bp) in den erwarteten Genotypen und Organen. Cx43 konnte in Wildtyp- und heterozygoten Tieren, aber nicht in homozygoten Tieren, gezeigt werden. In der Leber wird Cx43, neben den maßgeblichen Proteinen Cx32 und Cx26, vornehmlich in Ito-Zellen, Cholangiozyten und Endothelzellen und zeigte deshalb ein schwaches Amplifikat. Cx26 hingegen wurde nur in heterozygoten und homozygoten Tieren erwartet, sowie vermittelt durch eine endogene Expression in den Organen Gehirn, Leber und Testis von Wildtyp-Tieren.

4.2.2.4 Cx26 wird ektopisch im Herzventrikel exprimiert

Western Blot Analysen wurden exemplarisch von Gesamtprotein des Herzventrikels und des Gehirns adulter Tiere durchgeführt, um zu überprüfen, ob die rekombinanten Transkripte der Cx43²⁶-Allele in die entsprechenden Cx26-Proteine translatiert werden. Die Verminderung der Gendosis bei Cx43^{43/26}-Herzen führte zu einer gleichmäßig verringerten Expression aller phosphorylierten und unphosphorylierten Isoformen des Cx43-Proteins (Abb. 4.2.3). Eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Cx43 durch die Koexpression mit Cx26 konnte nicht beobachtet werden.



In Cx43^{43/26}-Herzen wurde das ektopisch exprimierte Cx26 neben Cx43 nachgewiesen und erwartungsgemäß kein Cx43 Protein in den Herzventrikeln von Cx43^{26/26}. Die Gleichgewichtsmenge der Cx43 ersetzenden Connexine stieg bei Cx43^{26/26} mit steigender Dosis des rekombinanten Cx43²⁶-Allels gegenüber den Cx43^{43/26}-Tieren an (Abb. 4.2.3). Die Western Blot Analysen von Gesamtprotein des Gehirns konnten nicht mit den vorliegenden Cx26-Antikörpern etabliert werden. Als Kontrollen wurde Proteinlysate der jeweiligen HeLa-Zell-Linie eingesetzt.

4.2.2.5 Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten des Herzens

Für die Ausbildung funktionstüchtiger Gap junction Kanäle war es notwendig, dass die Connexin Untereinheit als Untereinheiten von Connexonen in die Plasmamembran der Zelle eingebaut wurde. In der Herzmuskulatur befinden sich Gap junctions im Wesentlichen an den *Disci intercalares* (Glanzstreifen), d.h. in Bereichen, in denen die Kardiomyozyten durch Fasciae adherentes und Desmosomen stabil miteinander verbunden sind. Immunhistologisch befindet sich der Großteil der Cx43-Immunreaktivität im Bereich der ventrikulären *Disci intercalares*. Durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Cx43 in Verbindung mit Antikörpern gegen Cx26 wurde untersucht, ob der Transport in Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-Tieren zur Plasmamembran funktioniert und die Assoziation mit den *Disci intercalares* vorliegt. Für Cx26 wurden, in Gefrierschnitten (20 µm) des Herzens, keine Signale mit den vorliegenden Cx26-Antikörpern nachgewiesen. Cx43 wurde – wie beschrieben – an den *Disci intercalares* von Wildtyp- und Cx43^{43/26}-Tieren nachgewiesen, jedoch nicht in Cx43^{26/26}-Herzen (Daten nicht gezeigt).

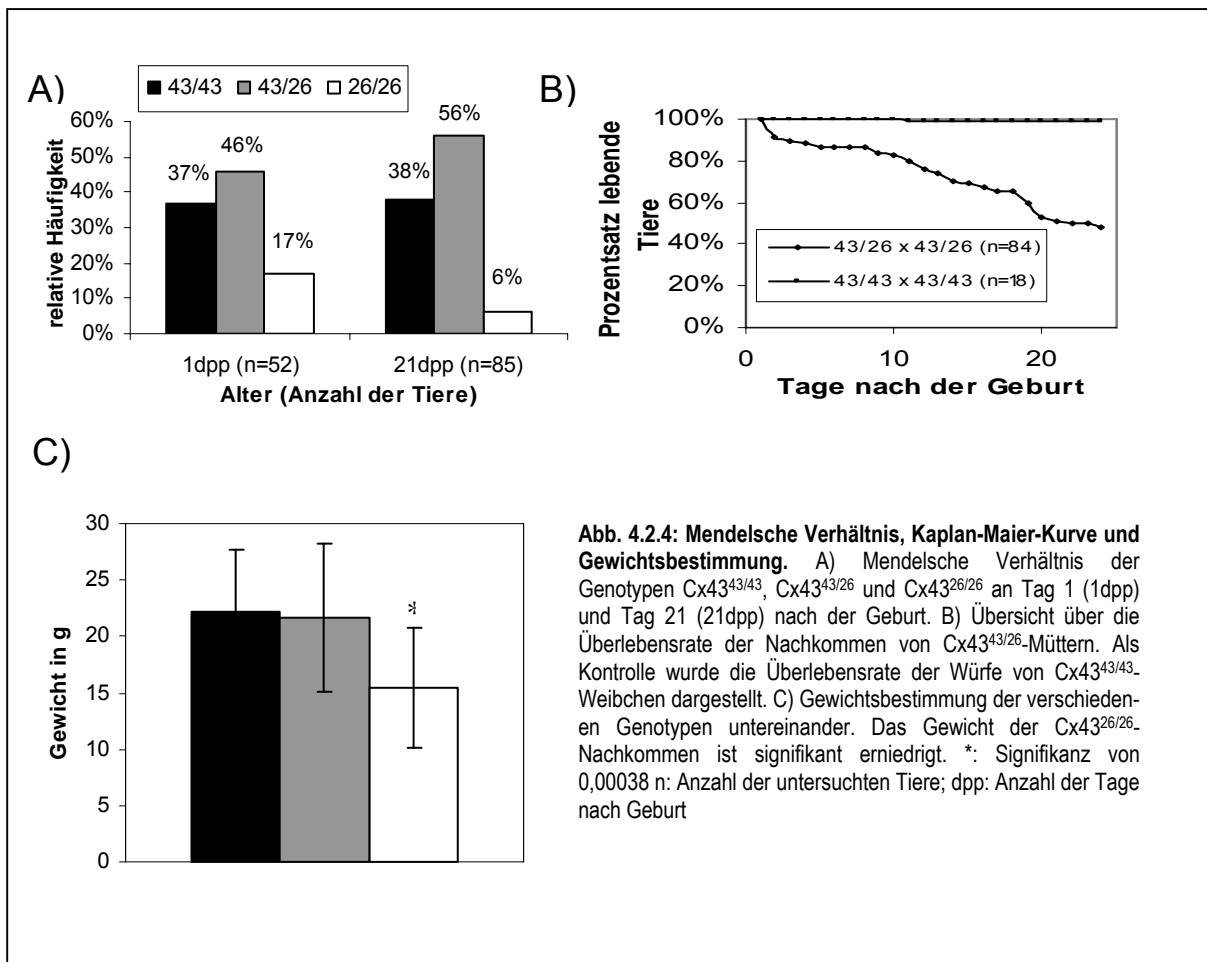
4.2.3 Vitalität, Fertilität und äußeres Erscheinungsbild von Cx43²⁶-Mäusen

4.2.3.1 Charakterisierung von Cx43²⁶-Mäusen

Bei Cx43^{43/26}-Weibchen wurden ähnliche Schwierigkeiten, wie im Fall der Cx43^{43/32}-Weibchen, in der Aufzucht der Nachkommen beobachtet. Unterschiede in der Wurfgröße im Vergleich zu Würfen von Wildtyp-Tieren am Tag der Geburt wurden nicht gefunden. Die Jungtiere waren lebhaft und zeigten beim Vergleich untereinander keine Auffälligkeiten in Größe oder Gewicht. Innerhalb der ersten Tage starben die Jungtiere vermehrt (Abb. 4.2.4 B). Bei den beobachteten Würfen starben 50 % aller Jungtiere in den ersten drei Wochen, unabhängig vom Genotyp und in einigen Fällen führte dies zum Verlust ganzer Würfe. Bei Verpaarungen von C57BL/6-Männchen mit Cx43^{43/26}-Weibchen trat dieses Phänomen ebenso auf, was darauf hindeutete, dass es weniger mit dem möglichen Auftreten homozygoter Jungtiere als mit der Aufzucht durch Cx43^{43/26}-Mütter korrelierte.

In Anbetracht der erhöhten postnatalen Mortalität wurde die relative Häufigkeit der Genotypen nach Mendel an Tag 1 und an Tag 21 (Abb. 4.2.4 A) bestimmt. Die Verteilung war schon an Tag 1 (dpp) zu Ungunsten der homozygoten Tiere verschoben. Die übliche Verteilung von 25 % Wildtyp zu 50 % heterozygot zu 25 % homozygot wurde nicht beobachtet. Eine Genotyp-Analyse nach 21 Tagen ergab, dass nur 30 % der geborenen Cx43^{26/26}-Tiere das Erwachsenenalter erreichten (Abb. 4.2.4 A).

Cx43^{43/26}-Mäuse unterschieden sich bei einem Vergleich nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern. Die homozygoten Tiere dagegen waren signifikant kleiner und wirkten schwächer. Die Gewichtsunterschiede manifestierten sich in den ersten drei Wochen nach der Geburt und blieben bei adulten Tieren erhalten (Abb. 4.2.4 C).



Die mikroskopischen Untersuchungen von Herz, Lunge, Leber, Darm, Nieren und Nebennieren, Gehirn und Keimdrüsen adulter Cx43^{43/26}-Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern keine Unterschiede. Die äußerlich erkennbare Hypotrophie spiegelte sich bei den homozygoten Tieren in einer

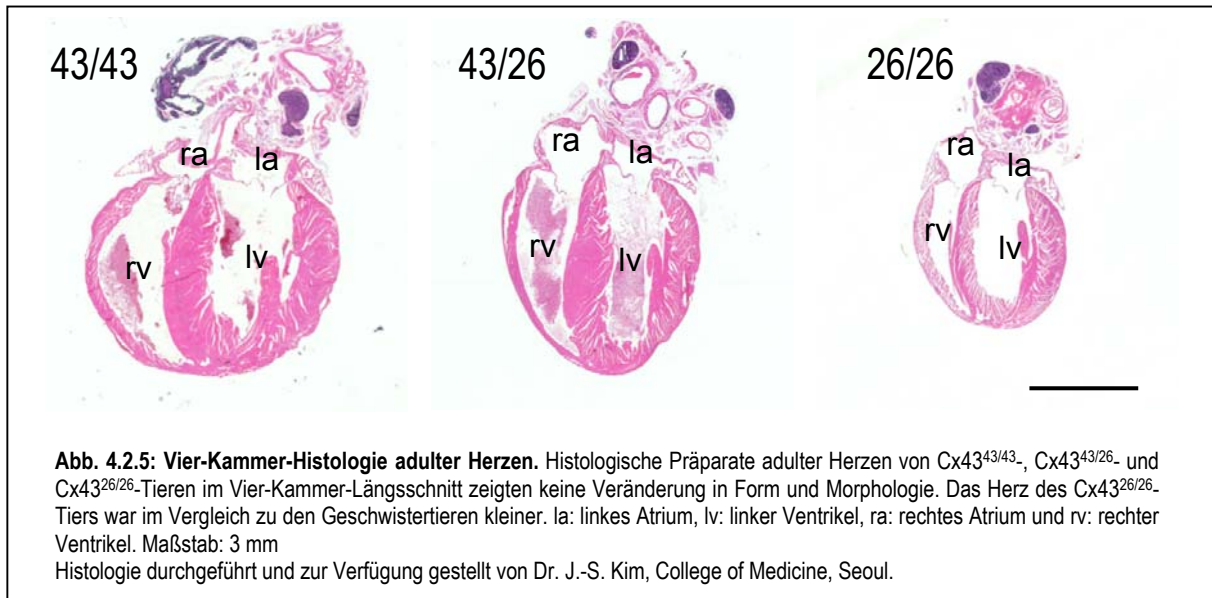
proportional verminderten Organgröße wieder. Darüber hinaus zeigten die Organe jedoch keine Auffälligkeiten im anatomischen oder feingeweblichen Aufbau, mit Ausnahme der Keimdrüsen (siehe 4.4.3.9).

4.2.3.2 Analyse der Herzen 10 Tage alter und adulter Cx43²⁶-Mäuse

Mäuse mit genereller Deletion des Cx43-Gens (Cx43 „Knock Out“) wiesen morphologische Anomalien des Herzens auf. Insbesondere zeigten diese Herzen eine vermehrte Bildung von *Trabeculae carneae* (Muskelbälkchen) im Bereich des rechten ventrikulären Ausflusstraktes. Dies führte nach der Geburt bei Einsetzen des Lungenkreislaufs zur tödlichen Zyanose. Die Herzen 10 Tage alter und adulter Cx43²⁶-Tiere wurden morphologisch, hinsichtlich ihrer Proteinexpression und mittels Elektrokardiographie hinsichtlich ihrer Funktion analysiert, um vergleichbare oder andere Anomalien aufzuzeigen.

4.2.3.3 Adulte Herzen zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten

Die Herzen adulter Tiere wurden durch Dr. J.-S. Kim (College of Medicine, Seoul, Korea) histologisch analysiert. Routine-Histologie an Längsschnitten der Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-Herzen (siehe 4.2.5), die eine Vier-Kammer-Ansicht ermöglichte, zeigte im Bereich des rechten ventrikulären Ausflusstraktes keine verstärkte Ausbildung von Herzmuskelbälkchen. Der prävalvuläre Bereich des *Truncus pulmonalis* homozygoter Tiere zeigte keinerlei Hinweise auf Obstruktionen. Somit wiesen Cx43²⁶-Tiere histologisch nicht denselben Phänotyp auf, der in Cx43KO-Tieren unmittelbar zum postnatalen Tod führte.



4.2.3.4 Echokardiographie und Elektrokardiogramme an 10 Tage alten und adulten Cx43²⁶-Tieren

In Zusammenarbeit mit Alexander Ghanem (Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn) wurde von 10 Tage alten und adulten Tieren, welche aus den Verpaarungen Cx43^{43/26}-Eltern hervorgegangen waren, Echokardiographie und Oberflächen-Elektrokardiogramme mit drei Ableitungselektroden angefertigt. Die pro Messung erhaltenen 6 Ableitungen wurden digitalisiert und in ein gemittelttes Elektrokardiogramm umgewandelt („signal averaged ECG, SAEKG“).

Weder in der Echokardiographie noch im Oberflächen-Elektrokardiogramm konnten Abweichungen unter den untersuchten Genotypen aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen führten zum Tod der Cx43^{26/26}-Tiere nach Stimulierung

Die elektrophysiologische Charakterisierung der Mäuse ergab eine schlechtere Sinusknotengeneratorfunktion, längere AV-Knoten Refraktärzeiten und eine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität in Cx43^{26/26}-Mäusen im Vergleich zu Cx43^{43/26} (Daten nicht gezeigt). Die Analysen wurden von Jan Schrickel (Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn) durchgeführt.

4.2.3.6 Cx43^{43/26}-Weibchen können ihre Jungen nur ungenügend ernähren

Die hohe vom Genotyp der Jungen unabhängige Sterblichkeit der Nachkommen (siehe 4.2.4 B) Cx43^{43/26}-Weibchen ging mit einer, von Geburt an verminderter Gewichtszunahme der Jungen in der Aufzuchtphase, einher. Auffälligkeiten im maternalen Verhalten von Cx43^{43/26}-Weibchen wurden nicht beobachtet. So säuberten sie ihre Jungen nach der Geburt und platzierten sie in einem Nest. Bei täglichen Kontrollen fanden sich immer alle Jungen im Nest. Außerhalb des Nests platzierte Jungen wurden durch die Mütter zurück gebracht, ebenso wie bei Cx43^{43/43}-Mütter. Auch wurden die Cx43^{43/26}-Mütter mit der gleichen Häufigkeit beim Säugen beobachtet wie die Kontrollmütter. Diese Beobachtungen legten nahe, dass es sich bei dieser dominanten, auf den Austausch von Cx43 durch Cx26 phänotypischen Veränderung um einen Defekt in der Milchproduktion oder Milchejektion handelte. Für die Expansion der Cx43²⁶-Linie bedeutete dies, dass zur Aufzucht der Jungen Ammenmüttern (Cx43^{43/43}) herangezogen werden mussten, um ein Überleben der Nachkommen heterozygot mutierter Eltern zu gewährleisten.

4.2.3.7 Fertilität von Cx43²⁶-Mäusen

In Bezug auf die Fertilität wurden bei Cx43^{43/26}-Männchen und -Weibchen keine Unterschiede - in Verpaarungshäufigkeit, Anzahl der Schwangerschaften nach Verpaarung und Wurfgrößen - im Vergleich zu

ihren Wildtyp-Geschwistern beobachtet. Demgegenüber zeigte sich bei routinemäßiger Verpaarung, dass Cx43^{26/26}-Tiere, sowohl Männchen als auch Weibchen, steril waren.

4.2.3.8 Anatomische und histologische Analyse der Milchdrüsen heterozygoter Cx43²⁶-Mäuse

Die Milchdrüsen wurden einer detaillierten anatomischen und histologischen Analyse unterzogen, da Cx43^{43/26}-Mütter Schwierigkeiten hatten, ihre Jungen zu ernähren, es aber keine Anzeichen für ein abnormes maternales Verhalten gab.

Die Milchdrüsen differenzieren sich erst während der Schwangerschaft. Aus den anfänglich wenigen und kaum verzweigten, in ein Fettpolster, eingelagerten Drüsengängen bildet sich ein stark verzweigter Baum abführender Milchgänge, an deren Enden sich Drüsenazini bilden. Bei der Geburt setzt dann die Laktation ein und die Drüsenazini füllen sich mit Milch. Die Stimulation der Brustwarze durch die säugenden Jungen führt zur Ausschüttung von Oxytozin im Hypophysenhinterlappen, dass die synchrone Kontraktion der Azini umgebenden, myoepithelialen Zellen bewirkt. Durch diese Milchejektion gelangt die Milch aktiv in eine Lakune unterhalb der Brustwarze, wo sie vom Jungen abgesaugt werden kann.

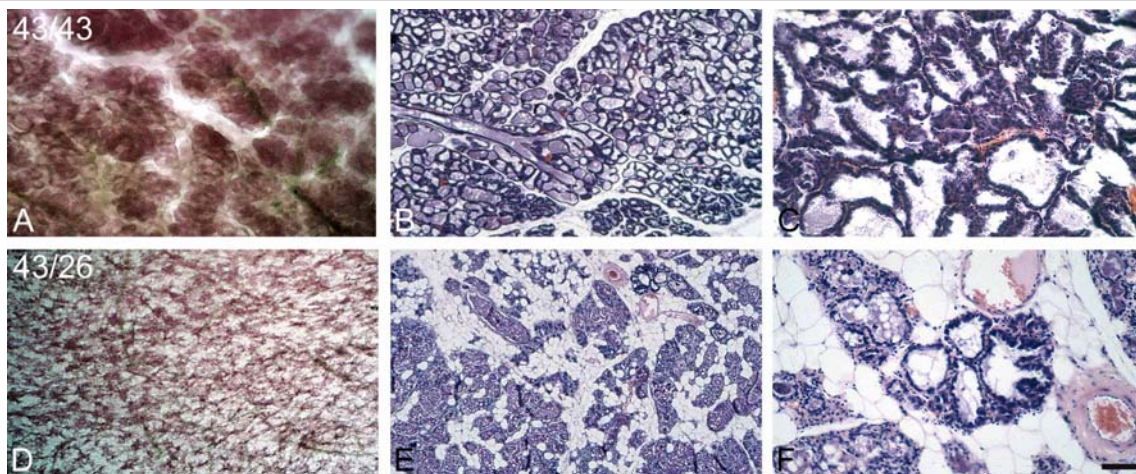


Abb. 4.2.6: Histologische Analyse der Brustdrüsen laktierender Weibchen. Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte (7 µm). Die Milchdrüsen eines Cx43^{43/43}- (A-C) und eines Cx43^{43/26}- (D-F) Weibchens wurden an Tag 9 nach der Geburt (9 dpp; je 8 Jungtiere) vollständig präpariert, in toto mit Karmin-Aluminium gefärbt (A; D) und für Paraffinschnitte (B; C; E; F) verwendet. Im Totalpräparat (A) des Cx43^{43/43}-Weibchens zeichnete sich eine Läppchengliederung ab, in der das Bindegewebe zurückgedrängt wurde und das Drüsenparenchym zunahm. Die Milchgänge mit den alveolaren Endstücken (A, B) entstanden durch Einsprossung. Die Alveolen (C) zeigten eine apokrine Sekretion. Das Totalpräparat des Cx43^{43/26}-Weibchens ähnelte einer nichtlaktierenden Brustdrüse (D-E). Dargestellt wurden die verzweigten Drüsengänge (Milchgänge, Ductus lactiferi), an deren Enden kleine knospenförmige Verdickungen erkennbar waren. Dabei handelte es sich um die Anlagen der Drüsenendstücke, der Alveolen, die normalerweise während der Gravidität eine Entfaltung erfahren würden, aber in dem Fall des Cx43^{43/26}-Weibchens in geringerer Anzahl vorlagen. In den hellen, ungefärbten Räumen zwischen den verzweigten Gängen lag Fettgewebe (E, F), der sog. Fettgewebkörper der Brustdrüse, der üblicherweise mit dem Drüsenwachstum zurückgedrängt würde. Die Alveolen erschienen kleiner im Durchmesser. Sie zeigten jedoch ebenfalls eine apokrine Sekretion und Milchfetttröpfchen im Lumen (F). Maßstab: 20 µm (C, F); 200 µm (B, E) und 500 µm (A, D)

Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Winterhager (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) erstellt.

Im Vergleich der Cx43^{43/43}- und Cx43^{43/26}-Brustdrüsen (siehe 4.2.6) laktierender Weibchen ähnelte das Cx43^{43/26}-Totalpräparat eher einer nichtlaktierenden Brustdrüse. Es wurden verzweigte Drüsengänge, an deren Enden kleine knospenförmige Verdickungen erkennbar waren, dargestellt, die jedoch bei den heterozygoten Tieren in geringerer Anzahl vorlagen. Der so genannte Fettgewebkörper (helle, ungefärbte Räume zwischen den verzweigten Gängen) wurde in diesem Gewebe nicht durch das Drüsenwachstum zurückgedrängt. Die Alveolen erschienen kleiner, zeigten aber ebenfalls eine apokrine Sekretion und MilCHFetttröpfchen im Lumen (Abb. 4.2.6 F).

4.2.3.9 Gonadendefekte bei Cx43^{26/26}-Mäusen

In der Aufzucht der Cx43²⁶-Tiere stellte sich heraus, dass sowohl Cx43^{26/26}-Männchen als auch -Weibchen steril waren. Aus diesem Grund wurden die Hoden (siehe 4.2.10 und 4.2.11) und Ovarien (siehe 4.2.8) makroskopisch und mikroskopisch näher betrachtet. Bei Cx43^{26/26}-Weibchen wurde vor der genaueren Betrachtung der weiblichen Geschlechtsorgane der Vaginalzyklus (siehe 3.5.3) im Vergleich zu Kontroll-Tieren bestimmt. Der Zyklus vollzog sich bei der Maus über 4 bis 5 Tage. In dieser Zeit durchläuft sie die Phasen des Prooestrus, Oestrus, Metoestrus und Dioestrus. Die verschiedenen Phasen sind durch das Vorhandensein unterschiedlicher Zelltypen charakterisiert. Es wurden keine Unterschiede in den Vaginalzyklen von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Weibchen beobachtet.

4.2.3.10 Makroskopische und histologische Untersuchung adulter Ovarien

Die Ovarien Cx43^{26/26}-Weibchen fielen makroskopisch, im Vergleich zu Cx43^{43/26}- und Cx43^{43/43}-Weibchen, durch ihre zur Größe der Tiere unproportional reduzierten Größe auf. Das Gewicht der Ovarien in Verhältnis gesetzt zum Körpergewicht zeigte eine signifikante Gewichtsreduktion der Cx43^{26/26}-Ovarien im Vergleich zu Cx43^{43/26}- und Wildtyp-Ovarien (Abb. 4.2.7).

Die anschließende histologische Untersuchung (siehe 4.2.8) wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Winterhager (Institut für Anatomie; Universität Duisburg-Essen) durchgeführt und zeigte in Wildtyp und heterozygoten Weibchen eine normale Follikulogenese.

Die Follikelreifung beginnt mit der Entwicklung eines kleinen Teils der pränatal angelegten Primärfollikel im Ovarium, in der Regel während des Ovarialzyklus. Mit jedem Ovarialzyklus entwickeln sich mehrere Primärfollikel zu Sekundärfollikeln, welche wiederum zu Tertiärfollikeln (Graaf-Follikel) heranreifen können. Sekundärfollikel, welche nicht das Tertiärstadium erreichen, gehen zugrunde und bilden so genannte atretische Follikel. In den Tagen vor der Ovulation vergrößert sich der Tertiärfollikel. Nach der Ovulation

entsteht aus den Resten des Follikelepithels (Granulosazellen) das Corpus luteum (Gelbkörper), welcher der Bildungsort von Östrogenen und Corpus luteum Hormonen (Progesteron) ist.

In den signifikant verkleinerten Ovarien (Abb. 4.2.7 und 4.2.8) homozygoter Weibchen hingegen wurden nur wenige Follikel und kein Corpus luteum gezeigt. Die Follikelreifung schien in einem frühen Sekundärstadium zu arretieren. In einigen Fällen war die Morphologie der Follikel beeinträchtigt. Die Oozyte fehlte und anstelle des Flüssigkeitsgefüllten Hohlraums (Follikelhöhle) konnte eine Zysten-ähnliche Struktur beobachtet werden. So genannte zystische Auftreibungen (Follikelzyste) eines Eifollikels im Ovarium entstanden üblicherweise bei ausbleibender Ovulation. Einige Ovarien bestanden aus nur einer großen Zyste.

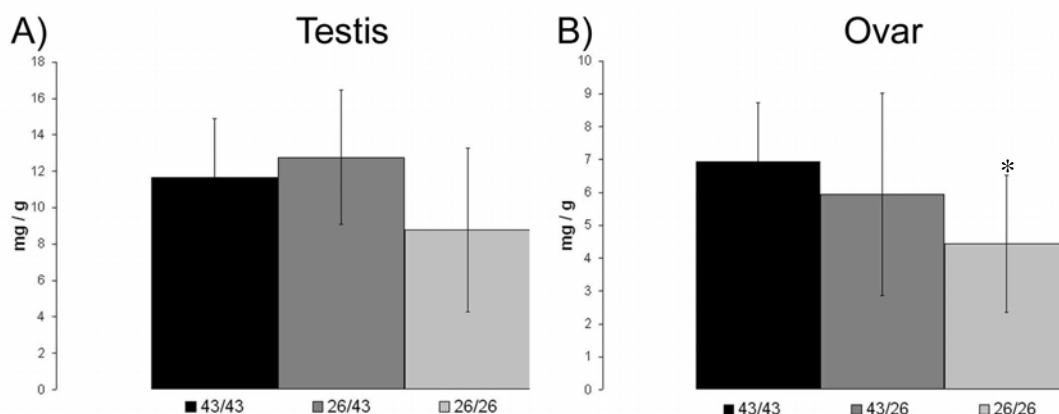


Abb. 4.2.7: Gonadengewichte in Relation zum Körpergewicht. Es wurden die Gewichte von Testis (A) und Ovar (B) der unterschiedlichen Genotypen Cx43^{43/43}, Cx43^{43/26} und Cx43^{26/26} untersucht. Die Signifikanz bei den Ovargewichten wurde mit 0,033 (*) ermittelt. Es wurden je Genotyp acht Tiere analysiert (n = 8).

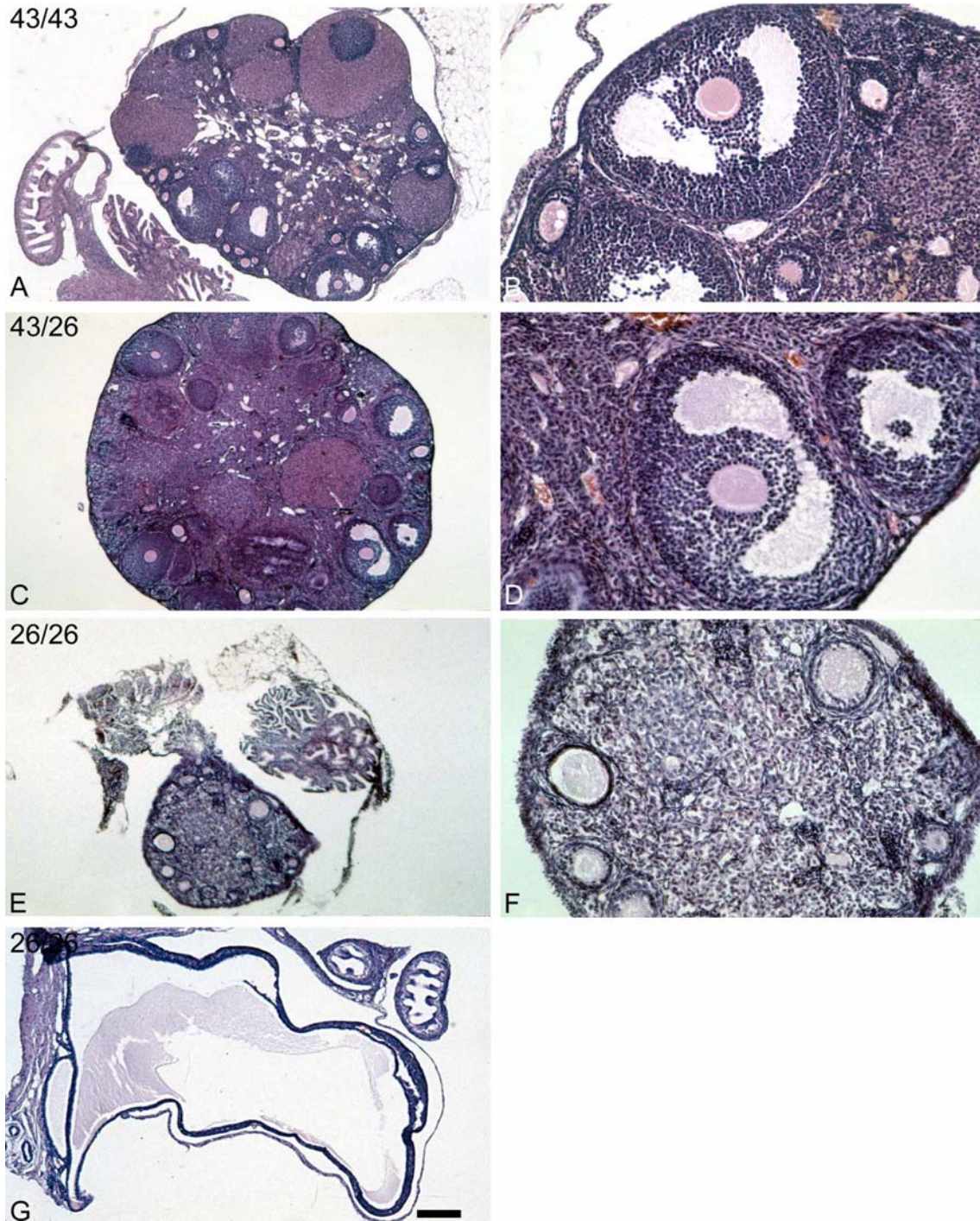
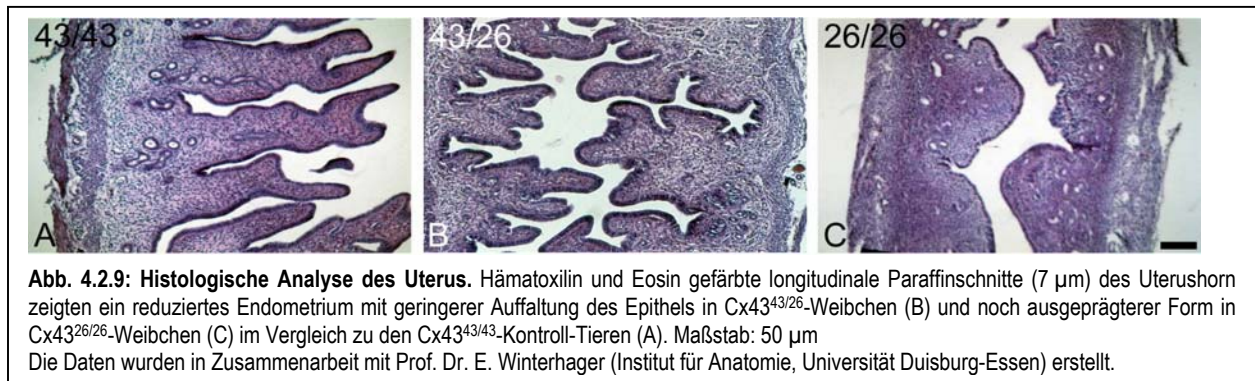


Abb. 4.2.8: Histologie der Cx43²⁶-Ovarien. Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte (7 μ m) der Genotypen Cx43^{43/43}, Cx43^{43/26} und Cx43^{26/26}. Die Cx43^{43/26}-Ovarien (C-D) waren nicht von denen der Cx43^{43/43}-Kontroll-Tiere (A-B) zu unterscheiden. In beiden Genotypen konnten Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien und Corpora lutea (Gelbkörper) dargestellt werden. Die Cx43^{26/26}-Tiere zeigten kleinere Ovarien (E) mit wenigen Follikeln und keine Corpora lutea. Die Follikelreifung schien in einem frühen Sekundärstadium zu arretieren. Die Morphologie einiger Follikel wurde beeinträchtigt. In diesen Fällen fehlte die Oozyte und anstelle dessen wurde der Follikel von einer Flüssigkeit ausgefüllt und wies eine Zysten-ähnliche Struktur (F) auf. Einige Ovarien bestanden aus einer großen Zyste (G). Maßstab: 50 μ m (B, D); 200 μ m (F) und 500 μ m (A, C, E, G)

Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Winterhager (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) erstellt.

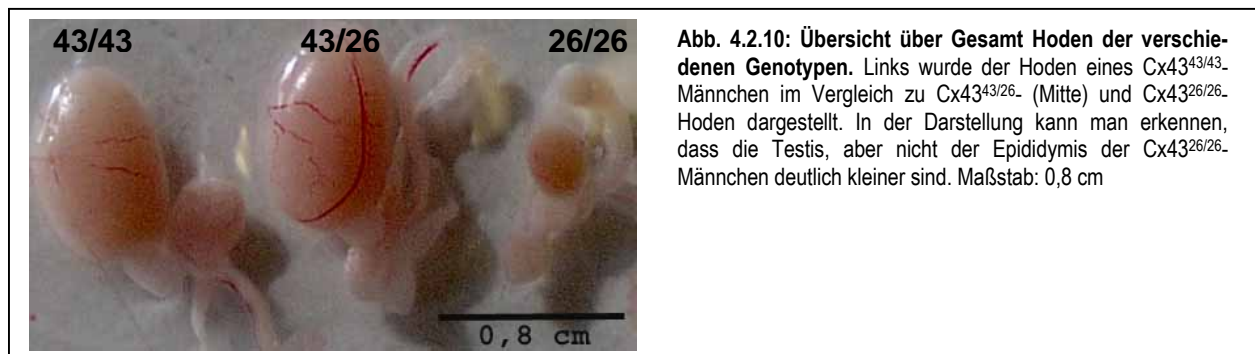
4.2.3.11 Histologische Analyse des Uterus

Das Epithel des Uterus ist in Wildtyp-Weibchen in Falten geworfen und besteht aus bewimperten und unbewimperten sekretorischen Zellen. In der Wand der Röhre sind unter anderem glatte Muskelzellen und zahlreiche Venen. In den Longitudinalschnitten (Abb. 4.2.9) wurde gezeigt, dass das Endometrium schon in heterozygoten Weibchen leicht reduziert vorlag, was in einer geringeren Auffaltung des Epithels resultierte und somit zu einem schmaleren Uterus führte. In homozygoten Weibchen war dieses Phänomen noch wesentlich ausgeprägter im Vergleich zu den Kontroll-Tieren.



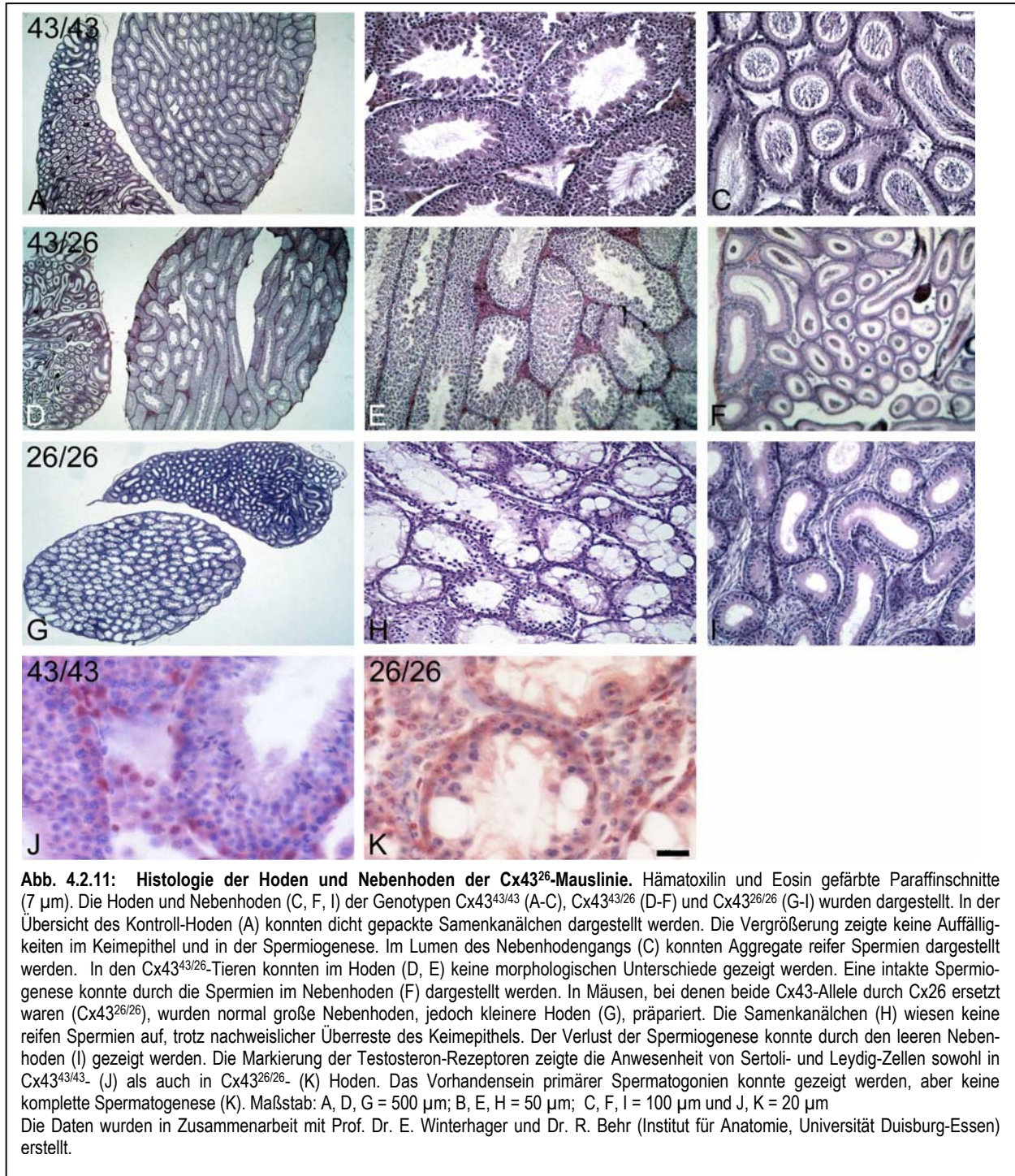
4.2.3.12 Makroskopische und histologische Untersuchung adulter Hoden

Die Hoden heterozygot mutierter Männchen unterschieden sich im äußeren Erscheinungsbild und in der Gewichtsanalyse nicht von denen ihrer Wildtyp-Geschwister. Dahingegen waren die Hoden, aber nicht die Nebenhoden (Epididymis), der homozygoten Cx43^{26/26}-Männchen stark, jedoch nicht signifikant, verkleinert (Abb. 4.2.10; Abb. 4.2.7).



Die histologischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. E. Winterhager und Dr. R. Behr (Institut für Anatomie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Die Samenkanälchen, Tubuli seminiferi, liegen aufgeknaeuelt in den Hodenläppchen, Lobuli testis, die durch feine Septen, Septula testis, voneinander getrennt sind (Abb. 4.2.11). Im interstitiellen Bindegewebe liegen die so genannten intersti-

tiellen Zellen, Leydig-Zwischenzellen. Diese wurden sowohl in homozygoten Hoden als auch in Wildtyp Kontrollhoden durch Anfärben der Androgenrezeptoren nachgewiesen.



Sie produzieren das männliche Geschlechtshormon Testosteron. Die Tubuli seminiferi contorti (Hodenkanälchen) werden von einer myofibrösen Bindegewebshaut, Lamina propria, umhüllt. Die Innenauskleidung besteht aus dem hohen Keimepithel, d.h. aus den Samen bildenden Zellen in verschiedenen Stadien der Spermatogenese, ferner aus den so genannten Sertoli-Zellen (Stütz- oder Fußzellen), welche in Wildtyp- ebenso wie in Cx43^{26/26}-Hoden durch das Anfärben der Androgenrezeptoren (siehe 4.2.11 J und K; siehe 3.7.1.6) bestätigt wurden. Normalerweise sind der Basalmembran eng angelagert die Spermatogonien runde Zellen mit chromatinreichen Kernen. Die Zellen der darüber liegenden Schicht sind etwas größer, Spermatozyten I. Ordnung und konnten in homozygoten Tieren (Abb. 4.2.11 H) nicht nachgewiesen werden, ebenso wie die weiter differenzierten Stadien, Spermatozyten II. Ordnung (Prä-spermatiden), Spermatiden und die lumen-nahen Spermien.

Die Beeinträchtigung der Spermatogenese in Cx43^{26/26}-Tieren konnte ebenfalls durch den „leeren“ Nebenhoden (Abb. 4.2.11 I) bestätigt werden. Der Epididymis liegt dem Hoden hinten oben an. Den Kopf bilden Ductuli efferentes testis, die in den stark gewundenen Nebenhodengang (Ductus epididymidis) führen, der den Körper und Schwanz bildet und Speicherort für die Spermien ist.

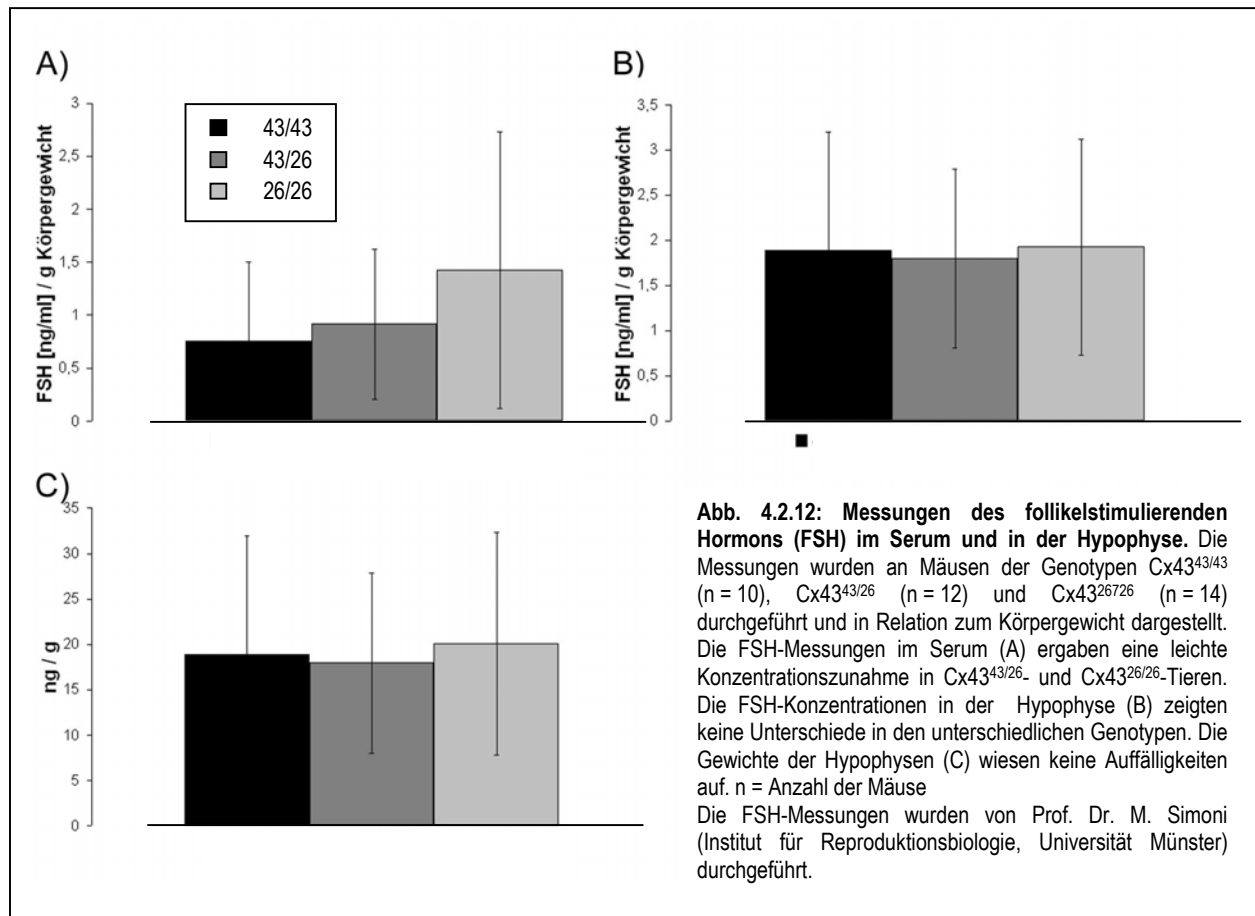
4.2.3.13 Ein Hypophysendefekt wurde nicht bestätigt

Die resultierenden Daten der Cx43²⁶-Mauslinie wie vermindertes Körpergewicht, Infertilität aufgrund der Gonadendefekte, sowie Laktationsprobleme der Cx43^{43/26}-Weibchen deuteten auf einen Hypophysendefekt hin. Dies führte zu einer Konzentrationsbestimmung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) in Hypophyse und Serum.

Die Konzentrationsbestimmung von FSH in Hypophyse und Serum wurde an insgesamt 36 Tieren im Labor von Prof. Dr. M. Simoni (Institut für Reproduktionsbiologie, Universität Münster) durchgeführt. Von den 10 Cx43^{43/43}-, 12 Cx43^{43/26}- und 14 Cx43^{26/26}-Tieren (Männchen und Weibchen) wurden Serum (siehe 3.7.3) und Hypophyse präpariert.

Die Konzentration von FSH in Serum und Hypophyse (siehe 4.2.12) wurde in Relation zum Körpergewicht betrachtet und dargestellt. Im Serum konnte man einen stetigen Anstieg der FSH-Konzentration von Cx43^{43/43}- zu Cx43^{43/26}- und zu Cx43^{26/26}-Tieren beobachten. Die FSH-Konzentration in den Cx43^{26/26}-Tieren war im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren doppelt so hoch, dennoch nicht signifikant erhöht. Im Vergleich zu diesem Ergebnis wurde in der Hypophyse keine Schwankung der FSH-Konzentration dargestellt. Ebenso wenig wurden Unterschiede in den Hypophysen-Gewichten der drei Genotypen gezeigt. Ein Hypophysendefekt wurde durch diese Ergebnisse nicht verifiziert. Die Daten weisen eher auf einen

hypergonadotropen Hypogonadismus (primärer Gonadendefekt) hin, was durch weiterführende Experimente gesichert werden muss.



5. DISKUSSION

5.1 Spezialisierung oder Redundanz: „Knock In“-Mausmodelle

In Experimenten zur Klärung der funktionellen Signifikanz der Connexin-Diversität, wurden die kodierenden Bereiche verschiedener Connexin-Gene nach homologer Rekombination aus dem Mausgenom entfernt. Cx43 (REAUME et al., 1995), Cx32 (NELLES et al., 1996), Cx37 (SIMON et al., 1997), Cx46 (GONG et al., 1997), Cx40 (SIMON et al., 1998), Cx26 (GABRIEL et al., 1998), Cx50 (WHITE et al., 1998), Cx45 (KUMAI et al., 2000), Cx36 (GÜLDENAGEL et al., 2001), Cx31 (PLUM et al., 2001), und Cx30 (TEUBNER et al., 2003). Eine spezifische, physiologische Rolle des einzelnen Connexins wurde jeweils nur in bestimmten Organen/Zelltypen der Connexin-defizienten Mauslinien untermauert (siehe dazu NICHOLSON und BRUZZONE, 1997; WHITE und PAUL, 1999). Eine Interpretation der Phänotypen ist aufgrund der vermeintlichen Redundanz sowie Kompensation durch andere ko-exprimierte Connexine häufig schwer. Cx43 beispielsweise wird bereits ab dem vom Zwei-Zell Stadium ausgeprägt (DE SOUSA et al., 1993) und trotzdem überleben Cx43-defiziente Mäuse die gesamte Schwangerschaft. Sie sterben kurz nach der Geburt an einem morphologischen Herzdefekt im rechten ventrikulären Ausflusstrakt, obwohl Cx43 auch in vielen anderen embryonalen Geweben nachweisbar ist (REAUME et al., 1995). Dieses Überleben der Cx43-defizienten Embryonen bis zur Geburt wirft Fragen bezüglich einer funktionellen Notwendigkeit der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions während der Embryogenese auf (HOUGHTON, 2005).

Die Erzeugung und Analyse einer Cx43/Cx32 Doppel-Defektmaus war ein Ansatz zur Klärung der funktionellen Kompensation von Connexinen in Zelltypen, in denen sie ko-exprimiert vorliegen. Es wurde gezeigt, dass die Doppelmutanten nach der Geburt aufgrund des bereits in Cx43-defizienten Tieren diagnostizierten Herzdefekts sterben. Weiterhin konnten keine morphologischen Abnormalitäten in Gliedmaßen, Schilddrüse oder Zahnentwicklung beschrieben werden, wo beide Connexine ko-exprimiert vorliegen (HOUGHTON et al., 1999).

Die differenziertere Betrachtung der funktionellen Spezialisierung, Redundanz oder Kompensation zwischen Connexinen ermöglichen „Knock In“ (KI)-Mausmodelle. Der Austausch der kodierenden Region eines Connexin Gens gegen ein Anderes oder das Verändern bestimmter Sequenzabschnitte z.B. durch Einfügen von Punktmutationen (Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD)) oder Deletionen (MAAB et al., 2004), könnte zu einem differenzierteren Verständnis ihrer Funktion *in vivo* führen. PLUM et al. (2000) hat gezeigt, dass der Verlust von Cx43 in Kardiomyozyten funktionell sowohl durch Cx32 und Cx40 (Herzfunktion), nur durch Cx40 in den Milchdrüsen und Herzmorphogenese, aber weder durch Cx32 noch Cx40 in Bezug auf

die Fertilität der Männchen kompensiert werden kann. Cx31 dagegen kann Cx43 während der kardialen Morphogenese funktionell nicht ersetzen (ZHENG-FISCHHÖFER et al., in press).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Mausmodelle bestätigen einerseits die schon dargestellten funktionellen Überschneidungen und Spezialisierungen (Cx43KICx26) und zum anderen zeigen sie erneut die Redundanz der Connexine (Cx26 in der Plazenta; Cx26KICx32).

5.2 Das Projekt: Cx26KILacZKICx32

5.2.1 Herstellung der transgenen Mauslinie Cx26KILacZKICx32

Eine Vielzahl von Connexinen kommt sowohl in differenzierten als auch undifferenzierten Zellen mit einem engen räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster vor. Eine präzise Charakterisierung dieses Musters ist unerlässlich zur funktionellen Analyse der beteiligten Connexine.

In dieser Arbeit sollte deshalb die Aufklärung der bis dahin nur lückenhaft bekannten zellulären Cx26-Verteilung in der Maus erfolgen. Hierzu wurde die kodierende Region des Cx26-Gens durch das LacZ-Reportergen ausgetauscht, welches unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promoters ausgeprägt wurde. Das Reportergen wurde mit loxP-Sequenzen flankiert, um den Austausch des Cx26-Leserasters durch die kodierende Region von Cx32 nach Deletion des LacZ-Gens zu ermöglichen. Das Cx32-Leseraster wird ebenfalls unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promoters exprimiert. Für eine Positiv-Selektion wird eine mit frt-Sequenzen flankierte PGK-Neomycin-Selektionskassette (MEYERS et al., 1998) hinter der kodierenden Region des Cx32-Gens eingefügt. Der Austauschvektor wurde mit Hilfe von Restriktionsspaltungen (Anhang) und kommerzieller Sequenzierung überprüft, bevor dieser in konstitutiv Flp- bzw. Cre-Rekombinase exprimierende *E. coli* Bakterien (BUCHHOLZ et al., 1996) transformiert wurde. Die erfolgreiche Deletion des LacZ-Gens durch die loxP-Sequenzen wurde zusätzlich in ES-Zellklonen, durch das transiente Einbringen eines pCre-Pac-Vektors, bestätigt. Die Funktionalität des verwendeten Reportergens wurde in HeLa-Zellen durch die transiente Transfektion eines Testvektors überprüft.

Die Erzeugung der Mauslinie erfolgte nach homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen; HM-1; MAGIN et al., 1992). Der Prozentanteil homolog rekombinierter ES-Zellklone lag mit nur einem positiven aus 680 gepickten Klonen unter 1 % und somit weit unter den erwarteten 1-3 % Transfektionseffizienz, vermutlich aufgrund schlechter Zugänglichkeit und/oder Austauschbarkeit des Cx26-Lokus. Allgemein wurden in unserer Arbeitsgruppe Schwankungen der Transfektionseffizienz zwischen 6 % und 27 % beschrieben (THEIS et al., 2000). Der homolog rekombinierte ES-Zellklon wurde in einer etablierten PCR-Reaktion überprüft.

Ein kleiner Teil der ES-Zellklone wurde, zusätzlich zur PCR-Analyse, im β -Galaktosidase-Nachweis eingesetzt. Eine Blaufärbung wurde in einigen ES-Zellklonen nachgewiesen, jedoch nicht in dem PCR-positiven Klon. Durch Southern Blot Analytik wurde die homologe Rekombination und Einzelkopie-Integration des Austauschvektors Cx26KILacZKICx32neo im Genom des PCR-positiven ES-Zellklons bestätigt (Anhang). Die Klone mit β -Galaktosidase-Aktivität zeigten entweder eine zufällige oder Mehrfach-Integration des auszutauschenden Konstrukts im Genom.

Durch Analysen zur Transkription und Translation von Connexinen in ES-Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Cx26 zwar transkribiert, aber nicht oder nur minimal translatiert wird (WÖRSDORFER, 2005). Dies entsprach der Beobachtung, dass eine β -Galaktosidase-Aktivität im positiven ES-Zellklon nicht nachgewiesen werden konnte.

Nach Blastozysteninjektionen dieses ES-Zellklons wurden chimäre Mäuse mit 40 bis 100 %-igem agouti-farbenen Fellfarbchimärismus geboren (Anhang). Die Übereinstimmung des durch die Fellfarbe reflektierten Chimärismusgrads mit der prozentualen Verteilung integrierter, rekombinanter ES-Zellen in anderen Geweben und Organen wurde für Maus-Chimären mehrfach nachgewiesen (MYSTKOWSKA et al., 1979). In der Regel prägen auch chimäre Mäuse, die aus weiblichen Embryonen (Spendertier-Blastozysten) und männlichen ES-Zellen (manipulierte ES-Zellen) entstanden sind, einen männlichen Phänotyp aus (ROBERTSON et al., 1986). Entsprechend waren vier der sechs erhaltenen Chimären Männchen. Alle sechs Tiere zeigten Keimbahn-Transmission des Cx26^{LacZn}-Allels ($n = \text{neo}$), d.h. sie vererbten das Cx26^{LacZn}-Allel an 50 % ihrer Nachkommenschaft. Die heterozygoten Nachkommen wurden zuerst zu Verpaarungen mit Flp-Rekombinase exprimierenden Mäusen eingesetzt, um die Neomycin-Selektionskassette zu deletieren. Des Weiteren wurden die Cx26^{26/lacZ}-Tiere mit PGK-Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart, was zur Deletion des LacZ-Reportergens und damit zum Austausch der Cx26 kodierenden Region gegen das Cx32-Gen führen sollte. PCR- (Abb. 4.1.5) und Southern Blot Analysen (Abb. 4.1.5) bestätigten die Etablierung der gewünschten Genotypen.

5.2.2 LacZ-Reportergenausprägung an Cx26^{26/lacZ}-Tieren

Ziel der Erzeugung einer LacZ-Reportermaus für Cx26 war allgemein die Charakterisierung der Cx26 Expression besonders in Zelltypen, in denen ein Vorkommen von Cx26 bislang umstritten ist. In heterozygoten Cx26^{26/lacZ}-Mäusen wurde das Reportergen unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promoters ausgeprägt.

Eine LacZ-Färbung wurde in einer Vielzahl bekannter Cx26 exprimierender Gewebe, wie Haut (RISEK et al., 1992, 1994; SALOMON et al., 1994), Leber (ROSENBERG et al., 1992; IWAI et al., 2000), Plazenta (GABRIEL

et al., 1998), Cochlea (KIKUCHI et al., 1995, 2000; FRENZ und VAN DE WATER, 2000) und Niere (HENNEMANN et al., 1992), wieder gefunden.

Das Cx26^{lacZ}-Allel wurde zu allen untersuchten Zeiten in der embryonalen Haut nachgewiesen (> E10), wobei die Expression mit fortschreitender Embryonalentwicklung intensiver wurde (Abb. 4.1.8). In adulten Tieren beschränkte sich die Expression auf die, den Haarschaft umgebenden, Keratinozyten (RISEK et al., 1992, 1994; SALOMON et al., 1994; FILIPPOV et al., 2003). Das LacZ-Färbemuster bestätigte das Vorhandensein von Cx26 im Ohr (Cochlea) ab dem Embryonalstadium E10, dies wurde von FILIPPOV et al. (2003; > E13) und BUNIELLO et al. (2004; E14) allerdings erst für spätere Stadien beschrieben. Außerdem wurde in den Embryonen (> E10) eine intensive Färbung im Bereich der Barthaare und in der Cornea detektiert. In der Plazenta wurde die Ausbildung von Cx26 Gap Junction Kanälen in den Synzytiotrophoblasten I und II der labyrinthischen Schicht beschrieben (GABRIEL et al., 1998) und durch die vorliegenden Daten bestätigt. Zusätzlich wurde in adulten Tieren die enzymatische Aktivität des LacZ-Reportergens in der Speiseröhre und der Zunge gezeigt (Abb. 4.1.9).

In ausstehenden Experimenten sollte eine Verifizierung des LacZ-Verteilungsmusters zu verschiedenen Embryonalstadien an Serienschnitten (7 µm) durchgeführt werden. Im Besonderen sollte der LacZ-exprimierende Zelltyp der Cochlea geklärt werden, da für die Cochlea Expression von Cx26 beschrieben wurde und in den Bildern der Embryonen (Abb. 4.1.8) eine starke Färbung in diesem Bereich zu erkennen ist. Des Weiteren sollte die Wirbelsäule (> E10) und das Gehirn - im Speziellen die Hypophyse (E12; Abb. 4.1.8) - einer näheren Betrachtung unterzogen werden, da auch hier eine intensive Färbung vermutet wird, die sich nur durch Serienschnitte bestätigen lässt (Erläuterungen hierzu siehe Cx26^{26/32}-Embryonen; 5.2.10).

5.2.3 Heterogene Cx26 Expression in der Leber war nicht eindeutig

Eine heterogene Cx26-Protein-Verteilung mit einer Anhäufung in den Periportalfeldern wurde bisher nur für die Rattenleber valide beschrieben (TRAUB et al., 1989; BERTHOUD et al., 1992). In dieser Arbeit wurde zumindest teilweise ein höherer Cx26-Anteil in periportalen Hepatozyten der Maus (ROSENBERG et al., 1992; IWAI et al., 2000; FILIPPOV et al., 2003) aus den LacZ-Verteilungsmustern der Cx26^{26/lacZ}-Lebern abgeleitet. Zu diesem Zeitpunkt war allerdings noch nicht geklärt, ob die beobachtete Heterogenität vielleicht abhängig vom Alter ist oder durch Unterschiede in der LacZ-Verteilung zwischen heterozygoten Tieren mit (Cx26^{26/lacZn}) und ohne (Cx26^{26/lacZ}) Neomycin-Kassette zustande kommt.

An Leberschnitten (Abb. 4.1.9) heterozygoter Tiere wurde anfänglich ein heterogenes Verteilungsmuster beobachtet, welches jedoch mit zunehmendem Alter der Tiere schwächer ausgeprägt schien. Im direkten

Vergleich von Leberschnitten aus Cx26^{26/lacZn}- und Cx26^{26/lacZ}-Tieren wurde in den Cx26^{26/lacZn}-Lebern keine Heterogenität festgestellt jedoch war eine leichte „Heterogenität“ in Cx26^{26/lacZ}-Leberschnitten aus Geschwistertieren zu beobachten. Die zunehmende Heterogenität bei zunehmender Schnittdicke könnte auf eine subjektive Betrachtungsweise zurückzuführen sein, ebenso wie auf die Tatsache, dass ein dünnerer Schnitt weniger markierte Kerne aufweist. Dass in den Lebern der heterozygoten Tiere mit Neomycin-Selektionskassette (Cx26^{26/lacZn}) keine Heterogenität gezeigt werden konnte, könnte an einem Einfluss des starken Promoters dieser Selektionskassette liegen. Ein negativer Einfluss dieses Promoters auf andere Genabschnitte wurde in der Literatur beschrieben (McDEVITT et al., 1997; SINGLE et al., 2000; MANLEY et al., 2001; BORNSTEIN et al., 2002). In der LacZ-Reporterm Maus von FILIPPOV wurde eine reduzierte Cx26-Expression beobachtet, was möglicherweise auf den negativen Einfluss der Promotersequenz der Neomycin-Transkriptionseinheit zurückzuführen ist (FILIPPOV et al., 2003). Die Leberschnitte von den LacZ-Reportermäusen von FILIPPOV zeigten, im Gegensatz zu den Cx26^{26/lacZ}-Tieren, eine Heterogenität des LacZ-Färbemusters bei Anwesenheit der Neomycin-Selektionskassette.

Die Frage der Heterogenität der Cx26-Ausprägung in Cx26^{26/lacZ}-Tieren, also Tiere ohne Neomycin-Selektionskassette, müsste durch zusätzliche Analysen geklärt werden. Eine Abhängigkeit der Heterogenität vom Alter der Tiere sowie der Promotersequenz der Neomycin-Kassette müsste glaubhaft bewiesen oder entkräftet werden, ebenso wie das Fehlen der Flp-Rekombinase im Genom. Hierfür müssten LacZ-Färbungen an Leberschnitten von 2, 4, 6, 8 und 12 Wochen alten Tieren (Cx26^{26/lacZ} und Cx26^{26/lacZn}) durchgeführt und verglichen werden. Die Expressionsanalysen sollten durch Antikörper-Nachweise für Cx26 und LacZ unterstützt werden.

5.2.4 Connexin26 wird in den Meningen exprimiert

Zur Klärung der Zelltyp- und Entwicklungs-spezifischen Cx26-Verteilung im Gehirn wurden Immunhistochemie, Einzelzell-PCR, Western Blot und Northern Blot Analysen, durchgeführt; trotzdem bleibt die Ausprägung von Cx26 in bezug auf einzelne Zelltypen des Gehirns umstritten. So wurde eine mutmaßliche Cx26 Ausprägung zum einen in Neuronen gezeigt (NADARAJAH et al., 1997; ALVAREZ-MAUBECIN et al., 2000; VENANCE et al., 2000; BITTMAN et al., 2002), wohingegen andere Studien eine neuronale Cx26-Expression ausschlossen (DERMIETZEL et al., 1989; MERCIER und HATTON, 2001; NAGY et al., 2001). In Abhängigkeit von der gewählten Untersuchungsmethode wurde weiterhin die Expression im adulten Säugetiergehirn in Astrozyten beschrieben (NAGY et al., 2001), was ebenfalls durch andere Analysen nicht bestätigt werden konnte (DERMIETZEL et al., 1989).

(1) Eine mögliche Erklärung der Diskrepanzen wäre eine Kreuzreaktivität des kommerziell erhältlichen Cx26-Antikörpers mit Cx30. Für Cx30 wurde die Expression in Astrozyten jedenfalls dokumentiert (NAGY et al., 1999). In der Gruppe von NAGY et al., (2001) wurde ferner eine Cx26-Expression in mehreren Gehirnregionen, einschließlich verschiedener Thalamuskern, Pallidum, Hypothalamus, Superior Colliculus und Cerebellum, beschrieben; im Gegensatz zu MERCIER und HATTON (2001), die eine Cx26-Expression vornehmlich in subpialen und subependymalen Schichten fanden. Dass unspezifische Bindungen mit anderen Connexinen nicht nur bei den Antikörpern auftreten, die gegen Epitope aus Cx26 gerichtet sind, wurde in der Literatur z.B. für Cx36 (MEIER et al., 2002) und Cx45 (MAXEINER et al., 2003) gezeigt. Ein weiterer Aspekt, der die Auswertung immunhistochemischer Resultate erschwert, ist die Tatsache, dass bestimmte Antikörper zusätzlich eine Spezifität aufweisen, die von der Menge und Verteilung des Zielproteins abhängt. So ist ein kommerziell erhältlicher Cx36-Antikörper für Untersuchungen in Gehirnregionen mit hoher Cx36-Expression verwendbar, wohingegen er in anderen Gehirnregionen eine unspezifische Kreuzreaktivität aufweist (MEIER et al., 2002).

(2) Positive Signale, die für Cx26 mittels der Einzelzell-PCR an GABAergen-Interneuronen (VENANCE et al., 2000) präsentiert wurden, könnten durch eine Kontamination, abstammend von den umgebenden Meningen, erklärt werden (FILIPPOV et al., 2003).

(3) Die LacZ-Reportergenexpression der von FILIPPOV et al. (2003) entwickelten LacZ-Reportermäuse im Gehirn bestätigten zwar eine eindeutige Cx26-Expression in den Zellen der Hirnhäute (Meningen), dagegen zeigten sie jedoch keine LacZ-Signale in Astrozyten oder Neuronen (FILIPPOV et al., 2003). Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten der vorliegenden Arbeit (Abb. 4.1.9), obwohl in den LacZ-Reportermäusen (FILIPPOV et al., 2003) eine Reduktion der Transkriptmenge des modifizierten Allels - und somit die Verlässlichkeit bzw. Intensität des LacZ-Signals - Anlass zur Kritik gab (ALTEVOGT und PAUL, 2004). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase an Gehirn-Dickschnitten der Cx26^{26/LacZ}-Mäuse ergaben positive Signale in den Meningen.

Die erzeugte Reportergen-Maus (Cx26^{lacZ}) kann somit für die Visualisierung der Zelltyp- und Entwicklungs-spezifischen Verteilung von Cx26 in der Maus herangezogen werden. Des Weiteren kann es Veränderungen in Verteilung und Expressionsniveau des Cx26-Proteins, als Antwort auf verschiedene physiologische und pathologische Prozesse anzeigen (Beispiele hierfür in GOLIGER und PAUL, 1995; KOJIMA et al., 1995; TAWADROS et al., 2001).

5.2.5 Heterozygote Cx26^{26/32}-Embryonen sind nicht lebensfähig

Homozygot Cx26-defiziente Mäuse sind embryonal letal und sterben an Tag 11 pc. Die Cx26^{-/-}-Embryonen sind kleiner, zeigen jedoch keine offensichtlichen Fehlentwicklungen. Ihre Letalität wird auf funktionelle Störungen wegen fehlender Cx26 Gap Junction Kanäle, innerhalb der Plazenta zurückgeführt. Im Gegensatz zur menschlichen Plazenta, die nur aus einem großen Synzytiotrophoblasten besteht, setzt sich die Mausplazenta aus den Synzytiotrophoblasten-Schichten I und II zusammen, welche über Gap Junctions verbunden sind und den Austausch von Nährstoffen, wie Glucose, gewährleisten (METZ et al., 1978; TAKATA, 1994). In der Rattenplazenta wurde ein Glucose-Transporter GLUT1 in der apikalen Membran der Synzytiotrophoblasten-Schicht I und der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten-Schicht II, nahe dem fötalen Blutstrom, lokalisiert (TAKATA et al., 1994; SHIN et al., 1996). Auch Cx26-Immunreaktivität wurde bei der Ratte zwischen den beiden Schichten nachgewiesen. Experimentelle Daten bestätigten bei der Maus, dass die Aufnahme und Abgabe von Glucose durch GLUT1 und durch einen interzellulären Transport mittels Cx26-Kanälen erfolgt (GABRIEL et al., 1998). Die Aufnahme des Glukose-Analogons 3-O-[¹⁴C]methylglukose war in Cx26^{-/-}-Embryonen an Tag 10 pc im Vergleich zu den Geschwisterembryonen um 60 % herabgesetzt. Die verbleibenden 40 % Glucose werden anscheinend über einen anderen Mechanismus vom Embryo aufgenommen, vermutlich über GLUT1 und GLUT3 (TROCINO et al., 1994; SHIN et al., 1996; SHIN et al., 1997). Ferner ist der Austausch anderer kleiner Moleküle, wie essentielle Aminosäuren, über Cx26 Gap Junction Kanäle in der Säugetierplazenta wahrscheinlich. Die schlechtere Aufnahme maternaler Nährstoffe oder auch Abgabe embryonaler Abfallprodukte könnte zum frühen embryonalen Tod beitragen (GABRIEL et al., 1998).

Die Aufklärung der funktionellen Signifikanz von Cx26-Kanälen in adulten Mausgeweben könnte durch Zelltyp-spezifische Deletionen eines geflochten Cx26-Gens (Cx26^{loxP/loxP}; COHEN-SALMON et al., 2002) oder durch einen funktionellen Austausch („Knock In“) mit einem anderen Connexin Leseraster erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die kodierende Region des Cx26-Gens gegen die des Cx32-Gens ausgetauscht. Die Deletion des Reportergens, in heterozygoten Cx26^{26/lacZ}-Tieren durch Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen, hatte die Expression von Cx32 unter dem endogenen Promoter von Cx26 zur Folge.

Die Ko-Expression und Ausbildung funktioneller, heterotypischer Kanäle von Cx26 und Cx32 ist bekannt und für die Leber hinreichend beschrieben, deshalb wäre eine funktionelle Ersetzbarkeit durch Cx32 möglich. Es ist aber nicht auszuschließen, dass gemischte Cx26 und Cx32 Gap Junction Kanäle

abweichende, physiologische Funktionen, trotz hoher Sequenzähnlichkeiten (62 % Proteinsequenz), ausbilden könnten. So wurde z.B. für Cx26 enthaltende Gap Junction Kanäle in der Plazenta ein Transport von Glukose, Nährstoffen mit geringer Molekülgröße und Ionen zwischen den Synzytiotrophoblasten-Schichten I und II vom maternalen zum fetalen Blut gezeigt (GABRIEL et al., 1998). Im Gegensatz zu Cx26 in der Plazenta wurde für Gap Junction Kanäle aus Cx32 in Hepatozyten eine effiziente interzelluläre Kommunikation durch spezielle Botenstoffe, wie Inositol-1,4,5-trisphosphate beschrieben (NELLES et al., 1996).

Unerwartet war das Ergebnis, dass heterozygote Cx26^{26/32}-Embryonen nicht lebensfähig waren. Verpaarungen mit PGK-Cre-Rekombinase tragenden Männchen erzeugten zwar Nachkommen, jedoch keine Cx26^{26/32}-Embryonen. Erwähnenswert ist, dass aus Verpaarungen mit Cre-Weibchen dagegen keine Nachkommen resultierten, obwohl die Tiere offensichtlich schwanger waren. Möglicherweise wurden die Nachkommen resorbiert oder starben vor der Geburt, was meist zum Tod des Muttertiers führte. Ein Erklärungsansatz wäre die Speicherung des Cre-Proteins in der Oozyte, was eine ubiquitäre Rekombination (siehe PGK-Cre; LALLEMAND et al., 1998) und demnach 50 % des heterozygoten Cx26^{26/32}-Genotyps zur Folge hätte.

Cx26^{26/32}-Embryonen wurden erst nach Präparation verschiedener Embryonalstadien (E12-E18; Abb. 4.1.10) bis zur Geburt nachgewiesen. Ein embryonales Sterben durch eine mögliche Unterversorgung der Embryonen an Tag 11 pc wurde ausgeschlossen, da die embryonale Fortentwicklung der Tiere bis zur Geburt stattfand. Ein Jungtier (P0) des Genotyps Cx26^{26/32} wurde tot, mit Plazenta und von der äußeren Embryonalhülle umgeben, geboren. Vermutlich werden diese Embryonen nach der Geburt außerhalb des Nestes platziert und von der Mutter gefressen.

Auffälligkeiten in der Morphologie der Embryonen konnten erst ab Tag 14 pc beobachtet werden. Die Cx26^{26/32}-Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums (siehe 4.1.11) zeigten teilweise deutliche Größenunterschiede und andere Merkmale im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern. Sie zeigten eine mehr oder minder starke ödem-artige Schwellung unter Haut. Die Haut selber wirkte blass, durchscheinend und schlecht durchblutet. Ansonsten variierten die äußeren, phänotypischen Ausprägungen stark. So war z.B. neben den ödem-artigen Schwellungen auffällig, dass bei einigen Tieren kein Unterkiefer ausgebildet wurde oder dass starke Hämatome unter der Haut vorhanden waren, was wiederum auf eine fehlende bzw. gestörte Angiogenese hindeuten könnte. Diese Vermutung wurde durch die makroskopische Betrachtung

der inneren Organe an Tag 18 pc und P0 verstärkt. Das Herz war normal entwickelt, wies jedoch keinerlei Anzeichen einer vorhandenen Durchblutung auf. Eine Störung der Blutbildung wurde zwar zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen, da Leber, Niere und Milz eine „normale“ Durchblutung zeigten, Einblutungen im Gewebe vorlagen und in Schnitten Erythrozyten dargestellt werden konnten. Die Lunge, ebenso wie verschiedene Organe des Bauchraums, waren retardiert und konnten daher nicht in allen untersuchten Embryonen beobachtet werden. Die Knochenstruktur stellte sich bei der Präparation als fragil dar.

5.2.6 Cx26^{26/32}-Embryonen: Die Entwicklung von Teratomen

Ein umfassender, histologischer Überblick der verschiedenen Gewebe und Organe wurde an Serienschnitten von Cx26^{26/26}- und Cx26^{26/32}-Embryonen (E17) erstellt. Die erste Betrachtung des heterozygoten Embryos vermittelte den Eindruck eines Teratoms („chaotisches Gebilde“). Eine Desorganisation und rudimentäre Ausbildung von Geweben und Organen wurde in den heterozygoten Cx26^{26/32}- im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen (Abb. 4.1.13) dokumentiert.

Das Herz zeigte zwar eine vollständige Kammerung mit Vorhöfen und Herzkammern, war jedoch dilatiert. Die Entwicklung einer Lunge konnte in einigen Embryonen nach Anfertigung von Serienschnitten beobachtet werden. Das kompakt wirkende Lungengewebe zeigte nur eine rudimentäre Entwicklung ohne erkennbare Alveolargänge und -bläschen und hatte zur Folge, dass die Pleuralhöhle nicht ausgefüllt wurde. Die inneren Organe der Bauchhöhle zeigten ebenfalls eine völlige Desorganisation und lediglich rudimentäre Ausbildung. Entsprechend dieser reduzierten Organogenese war die Bauchhöhle nicht von den Organen ausgefüllt, sondern zeigte zwischen den Organen ein auffallend ausgeprägtes, mesenchymales Bindegewebe. Die enorme Ausprägung mesenchymalen Bindegewebes wurde ebenfalls unter der Haut im ventralen und dorsalen Bereich sowie kranial detektiert. Die durch den Austausch beider Connexinleseraster hervorgerufenen phänotypischen Merkmale der Cx26^{26/32}-Embryonen waren sehr unerwartet. Die bis heute in der Literatur dargestellten Erkenntnisse geben weder einen Hinweis darauf, dass eine Letalität in der Embryonalentwicklung durch die Ausprägung eines (*trans*-) dominant-negativ wirkenden Connexins hervorgerufen werden könnte. Ferner ist das Ausmaß einer funktionellen Spezialisierung von Connexinen nach ihrer gezielten Ausschaltung in der Embryogenese bis heute erst lückhaft beschrieben (HOUGHTON, 2005). So überleben z.B. homozygote Cx43-defiziente Tiere erstaunlicherweise bis zur Geburt und sterben erst postnatal an einer Missbildung des Herzens. Und auch im Fall der homozygoten Cx26-defizienten Tiere wurden trotz der Letalität an Tag 11 pc, außer einer geringeren Größe, keine auffälligen morphologischen Veränderungen im Embryo gefunden. In beiden Cx43 „Knock In“-Mauslinien (Cx43KI32; PLUM et al., 2000; Cx43KICx26; vorliegende Arbeit) wurde ein (*trans*-) dominant-

negativer Effekt lediglich Organ-spezifisch – z.B. für das Brustdrüsengewebe - gezeigt. Nichtsdestotrotz ist hervorzuheben, dass eine Letalität im heterozygoten Zustand für Connexin Mausmodelle (KO oder KI) noch nicht beschrieben wurde.

5.2.7 Welche Erklärungsmöglichkeiten kommen für die embryonale Letalität heterozygoter Cx26^{26/32}-Embryonen in Betracht?

Vieles deutet darauf hin, dass eine bedingte Störung in der Embryogenese in den Cx26^{26/32}-Embryonen vorliegt, die möglicherweise auf einen (*trans*-) dominant-negativen Effekt zurückzuführen ist, da heterozygote Cx26-defiziente und Cx26^{26/LacZ}-Tiere lebensfähig sind. Die Aufklärung des vorliegenden Phänotyps erscheint komplex. Die nachfolgenden Abschnitte präsentieren deshalb eventuelle Erklärungsansätze, die sich unter anderem auf Signalwege der Embryogenese beziehen.

5.2.8 Verminderter Glukose-Transfer als Ursache der embryonalen Letalität

Homozygot Cx26-defiziente Mäuse sind wie beschrieben embryonal letal (siehe 1.2). Kann die Letalität der heterozygoten Cx26^{26/32}-Embryonen durch eine Verminderung des Glukose-Transports erklärt werden? Eine Verminderung des Glukose-Transports könnte durch eine *trans*-dominant-negative Wirkung des Cx32-Proteins hervorgerufen werden, was funktionell wiederum einer Deletion des Cx26-Gens gleichkommen würde. Müsste der Phänotyp dann nicht dem der Cx26-defizienten Maus entsprechen oder kann durch die Ausbildung heterotypischer Kanäle im Fall eines *trans*-dominant-negativen Effekts eine gewisse Diffusion von Glukose gewährleistet werden? Eine dominant-negative Wirkung des Cx32-Proteins könnte aufgrund einer Herabsetzung der Permeabilitäten in Cx26/Cx32-Mischkanälen ebenfalls eine Verminderung des Glukose-Transfers zur Folge haben. Allerdings ist auch diese Erklärung unwahrscheinlich, da nicht die gesamte embryonale Entwicklung betroffen erscheint. Dem Anschein nach sind nur die Gewebetypen betroffen, die vom Mesoderm abstammen. Ist die Letalität der homozygot Cx26-defizienten Mäuse ausschließlich auf den geringeren Glukose-Transfer zurückzuführen? Eine mögliche Überprüfung wäre durch einen konditionalen Ersatz des Cx26-Leserasters gegen das Cx32-Leseraster nur in der Plazenta denkbar.

5.2.9 Eine Störung in der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) als Ursache für embryonale Missbildungen

Die Gastrulation (Abb. 5.2) bezeichnet die Bildung der Keimblätter Ekto-, Ento- und Mesoderm, aus denen im Laufe der Embryogenese die verschiedenen Gewebetypen entstehen. Für diese Arbeit von Bedeutung

ist das Mesoderm, aus dem sich u. a. Binde- und Stützgewebe, Skelett-, Darm- und Herzmuskulatur, Blutgefäße, Blut- und Lymphzellen, Nephridien, Nieren, Ei- und Samenleiter entwickeln.

Das Mesoderm und Entoderm in Embryonen höherer Vertebraten entsteht durch einen embryonalen Mechanismus der Gewebe-Reorganisation, der so genannten epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT; siehe 1.6.2). An diesem Prozess sind hauptsächlich mesenchymale Zellen beteiligt, die durch eine invasive Motilität und weitere, definierte Merkmale charakterisiert sind. Sie können jede Körperschicht, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) enthält, infiltrieren und induzieren durch die EMT den Verlust epithelialer Merkmale von Epithelzellen, begleitet vom Erwerb mesenchymaler Charakteristika.

Vergleicht man nun die, in der vorliegenden Arbeit beobachtete, bizarre Desorganisation der Organe und das gehäufte Auftreten mesenchymaler Zellen in Cx26^{26/32}-Embryonen mit Geweben von Wildtyp-Embryonen – einschließlich Mesoderm, welche sich aus mesenchymalen Zellen mittels EMT entwickeln, dann würde eine Störung in der mesenchymalen Entwicklung nahe liegen.

Die Ausbildung temporärer Gap Junctions beim Zusammenstoßen zweier mesenchymaler Zellen könnte hierbei von Bedeutung sein (siehe 1.6.2). Bisher gibt es allerdings keine Hinweise auf eine mögliche interzelluläre Kommunikation (über Gap Junctions) bei der Infiltration oder der epithelial-mesenchymalen Transformation. BUNIELLO et al. (2004) zeigte jedoch, dass Connexine vornehmlich in den Geweben exprimiert werden, die vom Ektoderm und/oder Entoderm abstammen. Im frühen Epithel entwickeln sich viele Verbindungstypen und als wichtigste Verbindung wurden Haftverbindungen („Adhärenz Junctions“) beschrieben (HAY et al., 2005). Der Verlust von E-cadherin (CANO et al., 2000) zum Beispiel führt zum Verlust sämtlicher epithelialer Merkmale. Jedoch scheint der Verlust bzw. Austausch von Gap Junction Proteinen, insbesondere Cx26, ebenfalls nicht unbedeutend im frühen Epithel. Dies würde bedeuten, dass vielleicht eine Kommunikation durch Gap Junction Kanäle bei Infiltration oder Gewebe-Reorganisation vorliegen könnten.

Angenommen, Gap Junction Kanäle werden gebildet und wären für eine interzelluläre Kommunikation bei Infiltration oder Gewebe-Reorganisation notwendig, dann könnte eine dominant-negative Wirkung von Cx32 im Cx26^{26/32}-Embryo vorliegen, da für heterozygot Cx26-defiziente Mäuse gezeigt wurde, dass sie lebensfähig sind. Ein *trans*-dominant-negativer Einfluss wäre auszuschließen, wegen des außergewöhnlich hohen Maßes an Variationen der phänotypischen Merkmale. Eine Erklärung für die dominant-negative Wirkung könnte die Ausbildung von homo- und heterotypischen Cx26- und Cx32-Kanäle in unterschiedlicher Anzahl und Zusammensetzung sein. D.h. die Ausprägung der phänotypischen Merkmale wäre, infolge einer schwankenden Anzahl homo- und heterotypischer Kanäle, stärker bzw. schwächer ausgeprägt.

Eine trans-dominant-negative Wirkung hingegen würde einer funktionellen Deletion von Cx26 gleichkommen und somit würden nur noch heterotypische Kanäle gebildet. Eine mutmaßlich dominant-negative Wirkung könnte zudem durch eine unterschiedliche Regulation und Permeabilität von Cx26 und Cx32 begründet sein. So wird Cx32 im Gegensatz zu Cx26 z.B. durch Phosphorylierung reguliert und weist zusätzlich eine höhere Selektivität in Bezug auf die Permeabilität von Farbstoffmolekülen auf, welche auf heterotypische Kanäle übertragbar ist. Einerseits kann Lucifer yellow durch alle analysierten Connexin Kanäle passieren. Andererseits wurde für Cx31 und Cx32 gezeigt, dass Propidiumjodid und Ethidiumbromid schlecht oder gar nicht durchdringen können (ELFGANG et al., 1995). Zusammenfassend könnte dies darauf hindeuten, dass Cx26 und Cx32 Gap Junction Kanäle *in vivo* möglicherweise verschiedene biologische Funktionen haben könnten (siehe 5.1) und Cx32 nicht in der Lage ist während der Embryonalentwicklung des Mesoderms die Funktion von Cx26 zu kompensieren, sei es in heteromerer noch in heterotypischer Form.

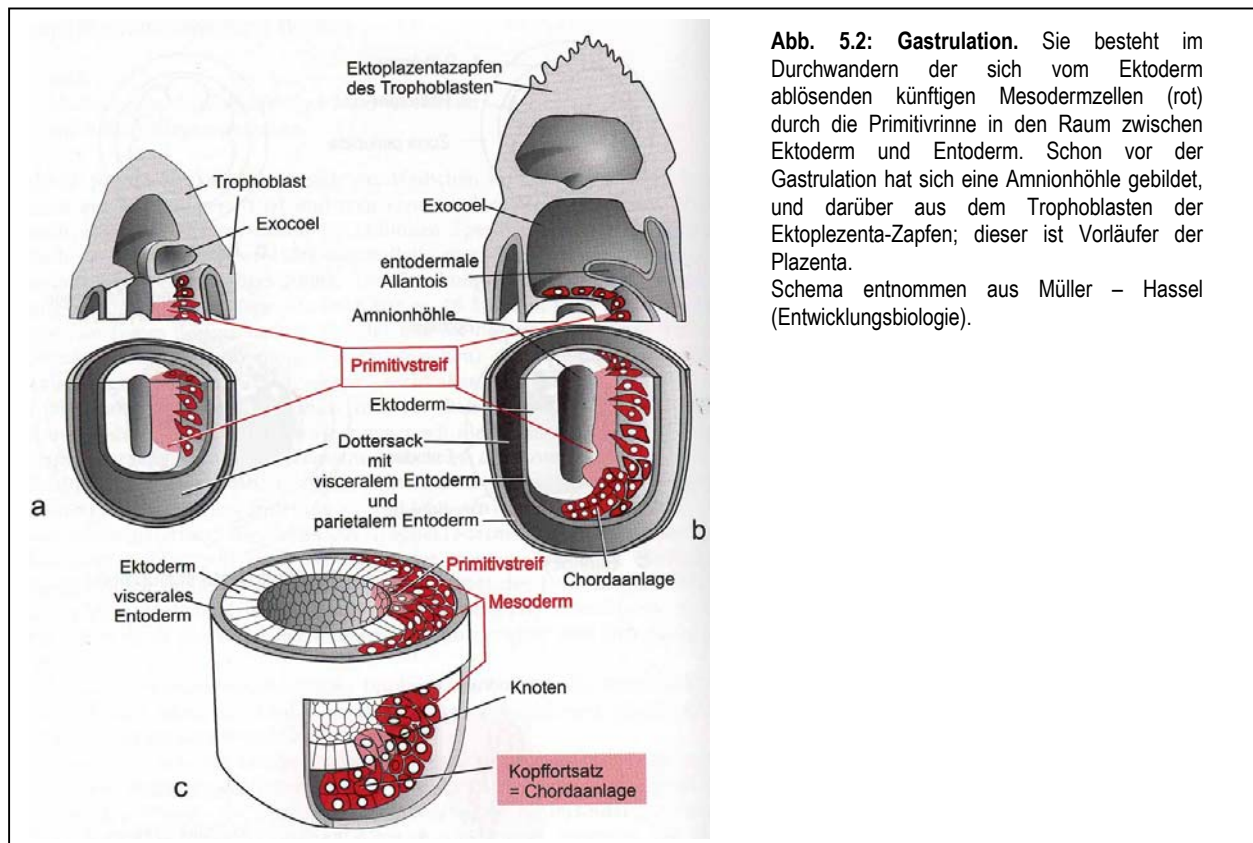


Abb. 5.2: Gastrulation. Sie besteht im Durchwandern der sich vom Ektoderm ablösenden künftigen Mesodermzellen (rot) durch die Primitivrinne in den Raum zwischen Ektoderm und Entoderm. Schon vor der Gastrulation hat sich eine Amnionhöhle gebildet, und darüber aus dem Trophoblasten der Ektoplezenta-Zapfen; dieser ist Vorläufer der Plazenta. Schema entnommen aus Müller – Hassel (Entwicklungsbiologie).

5.2.10 Ausblick für die Cx26^{26/32}-Mauslinie

Im Folgenden sollen Anregungen für weiterführende Experimente aufgezeigt werden. (1) Eine retardierte Entwicklung der Hypophyse in Cx26^{26/32}-Embryonen konnte beobachtet werden (Abb. 4.1.14). Die Adenohypophyse befand sich in der RATHKEsche Tasche und war vom Mesenchym umwachsen. Normalerweise sollte sich in diesem Stadium, die Adenohypophyse an die Neurohypophyse angelagert und das Mesenchym zurückgebildet haben. In Cx26^{26/lacZ}-Embryonen (Totalpräparat; Abb. 4.1.8) wurde eine LacZ-Färbung gefunden, möglicherweise an der Stelle, wo sich die Hypophyse befindet. Ob und wo genau die LacZ-Ausprägung lokalisiert ist, sollte jedoch durch Serienschritte LacZ-gefärbter Embryonen geklärt werden. (2) Eine ähnliche Beobachtung konnte für die Wirbelsäule (Abb. 4.1.8; E10) gemacht werden. In den Cx26^{26/lacZ}-Embryonen wurde im Bereich der Wirbelsäule eine LacZ-Färbung gezeigt, die eventuell Hinweise auf eine Cx26-Expression in mesenchymalen Zellen geben könnte. Auch hier sollte die genaue Lokalisation durch Serienschritte gezeigt werden. Sowohl bei der Hypophyse (1.6.6) als auch an der Wirbelsäule (1.6.2) konnte in der Literatur gezeigt werden, dass mesenchymale Zellen in unmittelbarer Nähe der Gewebe vorkommen bzw. dass sie an der Bildung des Gewebes beteiligt sind. (3) Verpaarung der Cx26^{26/lacZ}-Mäuse mit Gewebe-spezifischen Cre-Mäusen wie z.B. der MORE-Maus (Mox2Cre) (TALLQUIST und SORIANO, 2000). In der MORE-Maus wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle regulatorischer Elemente des Mox2-Lokus ausgeprägt und erst im Epiblast nach der Implantation aktiv. So könnte man eine frühe embryonale Störung in der Entwicklung ausschließen oder nachweisen. (4) Nachweis der Cx26-Expression durch das LacZ-Reportergen in den verschiedenen Stadien der Embryogenese.

5.3 Das Projekt: Cx43KI26

5.3.1 Vitalität und äußere Erscheinung der Cx43KICx32-Mauslinie

Cx43 wird bei Nagern nahezu ubiquitär in Herz, Gefäßen, Niere, Zähnen, Magen/Darm, Uterus, Ovar, endokrinen und exokrinen Drüsen, Gehirn, Lunge, Haut, Knochenmark und lymphatischen Organen exprimiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-„Knock In“-Tiere sind trotz des breiten Expressionsspektrums von Connexin43 lebensfähig. Im äußeren Erscheinungsbild sowie in der histologischen Analyse zeigten sie keine Besonderheiten. Bei näherer Betrachtung waren die Cx43^{26/26}-Tiere allerdings kleiner und zeigten einen Defekt in der Gonadenentwicklung.

Angesichts der Vielzahl der Funktionen die der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation zugeschrieben werden, weisen die Resultate auf eine Austauschbarkeit oder Redundanz unter den Mitgliedern der Connexin-Genfamilie hin. Ohne einen Vergleich mit adulten, homozygot Cx43-defizienten Mäusen ist jedoch nicht zu unterscheiden, ob das Ausbleiben offensichtlicher phänotypischer Veränderungen im jeweiligen Organ auf eine Kompensation durch natürlicherweise ko-exprimierte Connexine oder auf die Ausprägung des eingefügten Connexins zurückzuführen ist.

5.3.2 Brustdrüsedefekt heterozygoter Cx43KI26-Weibchen

In heterozygoten Weibchen wurde durch den Austausch von Cx43 gegen Cx26 ein dominanter Effekt in der Brustdrüse ausgeprägt, der in der Unfähigkeit resultierte, den Nachwuchs ohne Hilfe von Ammenmüttern aufzuziehen. Normalerweise entwickeln sich die Brustdrüsen nach der Geburt in Fettpolstern, in denen die Drüsengänge langsam auswachsen, sich aber mit Einsetzen der Pubertät schnell unter Ausbildung von Verzweigungen und endständigen Knospen (engl.: terminal end buds) ausbreiten und die gesamten Polster mit einem Baum von Gängen durchziehen. Die Knospen dienen als Organisationszentren des Auswuchses und der Verzweigung der Gänge zur Ausbildung der Drüsenazini. Die Sekretion der Milch durch die Drüsenepithelzellen der Azini setzt erst bei der Geburt ein. Die Milchejektion erfolgt als Reflex auf Stimulation der Brustwarzen durch die Jungen, die zu einer Oxytozin-vermittelten Kontraktion der Myoepithelialzellen in der Peripherie der Drüsenazini führt. Am Ende der Laktationsperiode kommt es zu einer Regression der Brustdrüse, die mit exzessiver Apoptose einhergeht (cf. HENNINGHAUSEN und ROBINSON, 1998; RUSSELL und LENG 1998). Die Kopplung der Epithelzellen wurde *in vivo* durch Farbstoffinjektion gezeigt (BERGA, 1984) und wird durch Cx26 und Cx32 ermöglicht, deren Expression während der Mammapoiesis induziert wird (POZZI et al., 1995). Die myoepithelialen Zellen dagegen sind durch Cx43

gekoppelt (POZZI et al., 1995). Eine Verbindung zwischen Myoepithel- und Epithelzellen durch Gap Junctions scheint nicht zu existieren (YAMANAKA et al., 1997).

In Ratten wurde gezeigt, dass es mit Einsetzen des Säugens zu einer Hyperphosphorylierung des Cx43-Proteins in Myoepithelzellen kommt, was auf eine funktionelle Bedeutung, wie z.B. Synchronisierung der Myoepithelzellen während der Kontraktion zur Milchejektion hindeuten würde (YAMANAKA et al., 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten histologischen Untersuchungen laktierender Brustdrüsen Cx43^{43/26}-Weibchen zeigten keine morphologischen Veränderungen in der Brustdrüsendifferenzierung, jedoch ähnelte das Totalpräparat (Abb. 4.2.6) eher einer nichtlaktierenden Brustdrüse. Die Anlagen der Drüsenendstücke, der Alveolen, die normalerweise während der Gravidität eine Entfaltung erfahren, lagen im Cx43^{43/26}-Weibchen in geringerer Anzahl vor. Die Alveolen erschienen kleiner im Durchmesser und zeigten – wie Cx43^{43/43}-Brustdrüsen – eine apokrine Sekretion und Milchfetttröpfchen im Lumen. Dies spricht für eine normale Laktation, wenn auch nicht ausreichend zur Versorgung der Nachkommen. Die reduzierte Proliferation und Sekretbildung könnte auf eine niedrigere Prolaktin-Sekretion hinweisen.

Der Phänotyp kann nicht auf eine verminderte Dosis des Cx43-Proteins zurückgeführt werden, da sowohl heterozygote Cx43-defiziente Mäuse als auch Cx43KI40-Weibchen (PLUM et al., 2000) keine Schwierigkeiten bei der Aufzucht ihrer Jungen aufweisen. Die dominante Wirkung könnte verschiedene Ursachen haben: (1) Eine Kopplung mit den basal liegenden, Cx26 und Cx32 ausprägenden Epithelzellen wäre durch die Expression von Cx26 in Myoepithelzellen denkbar, was aufgrund der Inkompatibilität heterotypischer Kanäle zwischen Cx43 und Cx26 bzw. Cx32 in Wildtyp-Mäusen ausgeschlossen ist. Eine funktionelle Beeinträchtigung der Myoepithelzellen könnte durch diese Fehlkopplung, und dem damit verbundenen Austausch von Botenstoffen oder Ionen, hervorgerufen werden. (2) Das Cx26-Protein könnte einen *trans*-dominant-negativen Einfluss auf die Bildung von Cx43-Kanälen ausüben, was einer funktionellen Deletion des Cx43-Gens entsprechen würde. Bei homozygot Cx43-defizienten Mäusen müsste demnach das gleiche Phänomen auftreten, was aufgrund der neonatalen Letalität nur mittels einer konditionalen „Knock Out“-Maus überprüft werden kann. Die Korrelation des Brustdrüsedefekts mit dem Auftreten und der Regulation von Cx43 in Myoepithelzellen würde für einen lokalen Defekt (Milchejektion) sprechen, jedoch könnte auch ein übergeordnetes, regulatorisches System involviert sein. So werden z.B. von der Hypophyse sowohl Hormone für die Milchejektion als auch für die Proliferation und Sekretbildung der Brustdrüsen ausgeschüttet.

In BRY et al. (2004) wurde Brustdrüsengewebe homozygoter Cx43KI32-Weibchen auf Wildtyp-Mäuse transplantiert und die Entwicklung während Schwangerschaft und Laktation evaluiert. Die histologischen Analysen zeigten eine normale funktionelle Differenzierung - apokrine Sekretion und Ansammlung von Milchfetttröpfchen im Lumen – und keine Abweichungen zu Wildtyp-Tieren. Diese Resultate würden eher auf eine Störung in der Hormonsekretion als auf einen lokalen Defekt in der Milchejektion hindeuten. Bei den in dieser Arbeit analysierten Brustdrüsen der Cx43^{43/26}-Weibchen (Abb. 4.2.6) scheint ebenfalls, wie bei Cx43^{43/32}-Weibchen, eine reduzierte Milchdrüsen-Proliferation oder gestörte Milchejektion vorzuliegen, was in Anlehnung an die beschriebenen Erkenntnisse der homozygoten Cx43KI32-Mäusen (BRY et al., 2004; PLUM et al., 2000), auf eine gestörte Hormonsekretion – Prolaktin oder Oxytozin - der Hypophyse hindeuten könnte.

Prolaktin zum einen wird in der Adenohypophyse gebildet und gehört zu der Gruppe der so genannten glandotropen Hormone. Es wirkt auf nachgeschaltete Hormondrüsen ein, wobei es die Proliferation und Sekretbildung in der Brustdrüse stimuliert. Eine adäquate Zell-Zell-Koordination sowie physiologische Synchronisation (angemessene und zeitlich koordinierte Hormonsekretion) innerhalb der Drüse ist unentbehrlich und wird durch Gap Junction vermittelte Kommunikation gewährleistet. In der Ratten-Hypophyse wurde sowohl die Expression von Cx43 (MEDA et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1993) als auch die von Cx26 (MEDA et al., 1993) beschrieben. Außerdem zeigten Analysen an der Hypophyse des Nerz, dass die Cx43 Expression in follikulären Sternzellen mit einem schwankenden Prolaktin-Gehalt variiert (VITALE et al., 2001).

Oxytozin zum anderen unterliegt einem anderen Regulationsmechanismus. Es wird im Hypothalamus gebildet und in der Neurohypophyse gelagert und abgegeben und bewirkt die Kontraktion sensibilisierter glatter Muskelfasern z.B. in Uterus und Mamma. Für Oxytozin-defiziente Mäuse wurde gezeigt, dass sie, aufgrund eines Defekts der Milchejektion, ihre Jungen nicht ernähren (NISHIMORI et al., 1996; YOUNG et al., 1997). Anders als bei Cx43^{43/26}- und Cx43^{43/32}-Mäusen führt dies jedoch innerhalb von 24 Stunden zum Tod der Nachkommen. Demnach könnte die Oxytozin-Freisetzung in heterozygoten Cx43^{43/26}-Weibchen zwar deutlich reduziert, aber noch ausreichend für eine residuale Milchejektion, die es den Jungen erlaubt bis in die zweite Woche nach der Geburt zu überleben.

Weitere Experimente zur Beschreibung und Lokalisation des Defekts und des zugrunde liegenden Mechanismus sind notwendig. Wie die Brustdrüsen der Cx43^{32/32}-Weibchen sollten auch die der Cx43^{26/26}-Tiere auf Wildtyp-Weibchen transplantiert werden. Dies würde einer Hormonsubstitutionstherapie

gleichkommen und zeigen, ob (1) die Brustdrüsen den gleichen Phänotyp aufweisen wie die der bereits transplantierten Brustdrüsen aus Cx43^{32/32}-Weibchen, und (2) ob ein lokaler Defekt im Brustdrüsengewebe ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise vorliegende Störungen der Hormonsekretion könnten außerdem durch Hormonmessungen im Serum und histologische Analysen der Hypophyse abgeklärt werden.

5.3.3 Gonadendefekte in Cx43KICx26-Mäusen

Die generelle Lebensfähigkeit heterozygoter und homozygoter Tiere sowie die Kompensation des Cx43-Verlustes in der Morphogenese und Funktion des Herzens impliziert ein hohes Maß an funktioneller Redundanz zwischen Cx43 und Cx26. Dies trifft jedoch nicht auf alle Zelltypen zu. So scheint Cx43 für die Migration, Proliferation und Differenzierung der Keimzellen essentiell zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde weder bei Cx43^{26/26}-Männchen noch bei Cx43^{26/26}-Weibchen eine vollständige Gametogenese nachgewiesen. Der Verlust von Cx43 kann durch Cx26 offensichtlich nicht kompensiert werden, jedoch teilweise durch Cx32 und Cx40 in Cx43KI32- und Cx43KI40-Weibchen (PLUM et al., 2000). Homozygot Cx43-defiziente Embryonen zeigten verkleinerte Gonaden und eine verminderte Zahl primordialer Keimzellen (JUNEJA et al., 1999). Die Keimzelldefizienz konnte bis zum Tag 11,5 pc, also noch vor Manifestation eines offenen Sexualdimorphismus, zurückverfolgt werden. Weibliche und männliche Gonaden im Embryo waren gleichermaßen betroffen. Daten von adulten homozygoten Cx43-defizienten Tieren liegen aufgrund der neonatalen Letalität nicht vor, jedoch deuten Organkulturen von Ovarien auf eine blockierte Follikulogenese auf der Stufe der Primärfollikel blockiert hin (JUNEJA et al., 1999).

Die Hypophyse (1.6.6), als übergeordnetes Zentrum für die Steuerung vieler endokriner Hormonsekretionen, ist eine lebenswichtige Drüse. In der Adenohypophyse werden zahlreiche Hormone produziert, die entweder auf andere innersekretorische Drüsen oder direkt auf ihre Zielzellen einwirken. So wird die Proliferation und Sekretbildung in der Brustdrüse durch Prolaktin, die Follikelreifung und Spermatogenese durch Folitropin (FSH) und die Hormonbildung in den Zwischenzellen von Ovar und Hoden durch Lutropin (LH) stimuliert. Diese Hormone gehören im Gegensatz zu Somatotropin, welches das Körperwachstum stimuliert, zur Gruppe der glandotropen Hormone.

Die Beurteilung der in dieser Arbeit beschriebenen Defekte – Minderwuchs (4.4.3.1), Brustdrüsen- (4.4.3.8) und Gonadendefekte (4.4.3.9) - sollte somit nicht nur begrenzt auf das betroffene Gewebe, sondern ebenfalls unter Einbeziehung einer möglichen Störung der Hypophysenfunktion auf den ganzen Körper vorgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bildung und Sekretion von FSH (follikel-stimulierendes Hormon) als Teilaspekt einer möglichen hypophysären Störung bearbeitet. FSH-Messungen wurden an Seren und Hypophysen der Cx43KI26-Mauslinie vorgenommen und in Relation zum Körpergewicht beurteilt. Eine erhöhte FSH-Ausschüttung ins Serum jedoch eine unveränderte FSH-Bildung in der Hypophyse von Cx43^{26/26}-Tieren wurde ermittelt. Diese wahrscheinlich kompensatorische Erhöhung der zirkulierenden Gonadotropine würde auf einen primären (hypergonadotroper) Hypogonadismus hindeuten. Normalerweise resultiert ein primärer gonadaler Defekt aus angeborenen oder erworbenen Fehlanlagen (Gonadenagenesie bzw. Gonadendysgenesie). Eine Erniedrigung der Gonadotropine im Serum wiederum wäre die Folge einer dienzephalhypophysären Störung.

Weiterführende Untersuchungen an Cx43^{26/26}-Männchen wären zur Klärung eines primären gonadalen Effekts notwendig. Zwei mögliche Ansätze wurden nachfolgend diskutiert: (1) Erhöhte FSH-Ausschüttung durch einen veränderten Testosteronspiegel. Testosteron wird in Leydig-Zellen durch LH-Stimulation (luteinisierendes Hormon) gebildet und über das Hypothalamus-Hypophysen-System kontrolliert und reguliert. Im Rahmen eines Feedback-Mechanismus kann es sowohl die LH- als auch die FSH-Ausschüttung in der Hypophyse beeinflussen. Ein niedriger Testosteronspiegel würde eine höhere Sekretion zur Folge haben. Eine mögliche Veränderung des Testosteronspiegels könnte durch eine makroskopische Betrachtung und Gewichtsanalyse der Bläschendrüse (Samenblase) erfolgen, da sie bei zu viel/wenig Testosteron stark vergrößert/verkleinert vorliegt. Ein verkleinerter Hoden, gezeigt bei den Cx43^{26/26}-Männchen, könnte somit ein erster Hinweis auf zu viel Testosteron sein. Eine zusätzliche Bestimmung des Testosteronspiegels im Serum ist nötig, um diese Hypothese zu stützen. (2) Erhöhte FSH-Ausschüttung durch eine fehlende Inhibin-Rückkopplung. Inhibin wird in Sertoli-Zellen produziert und ausgeschüttet. Es reguliert die FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse. In Inhibin-defizienten Mäusen wurde eine FSH-Erhöhung gezeigt, die bei Männchen trotz normaler, testikulärer Entwicklung zur Infertilität und zu einer vergrößerten Bläschendrüse führte und bei Weibchen hämorrhagische und zystische Ovarien zur Folge hatte (KUMAR et al., 1999).

Beide Hypothesen müssen durch weiterführende Analysen überprüft werden, da Cx43 Gap Junction Kanäle sowohl zwischen Sertoli-Zellen als auch zwischen Leydig-Zellen sowie zwischen Leydig-Zellen und Spermatogonien und Spermatozyten nachgewiesen wurden. Neben Cx43 wurden aber auch Transkripte für Cx26, Cx30, Cx31, Cx32, Cx33, Cx37 und Cx45 im Hoden nachgewiesen (TAN et al., 1996; RISLEY et al., 1992; PELLETIER, 1995, PLUM, Doktorarbeit 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind weitere Hinweise darauf, dass eine Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation in einigen Geweben essentiell ist und nicht kompensiert bzw. ersetzt werden kann.

5.3.4 Allel-spezifische Kompensation der Connexin43-Defizienz bei der Herzmorphogenese

In homozygot Cx43-defizienten Mäusen kommt es zu einer Verengung des rechts-ventrikulären Ausflusstrakts durch die vermehrte Bildung von Muskelbälkchen (Trabeculae carnae), die teilweise zu blind endenden Taschen fusionieren (REAUME et al., 1995; YA et al., 1998). Anhand verschiedener transgener Mauslinien konnte nachgewiesen werden, dass dieser Phänotyp direkt mit der Menge an ausgeprägtem Cx43 Protein in migrierenden Neuralleistenzellen verknüpft ist (LO et al., 1999). Milde morphogenetische Herzdefekte konnten zudem auch bei heterozygoten Cx43-defizienten Embryonen beobachtet werden (HUANG et al., 1998b). Im adulten Herzen sind Gap Junctions für die elektrotonische Kopplung und damit für die gerichtete und geordnete Depolarisation und Kontraktion verantwortlich.

Die generelle Lebensfähigkeit von Cx43^{26/26}-Tieren zeigte, dass der Verlust des Cx43-Proteins kardial nicht nur durch Cx40 und – weitgehend - durch Cx32 sondern auch durch Cx26 kompensiert werden kann. Im direkten Vergleich der Herzen von Cx43^{43/43}-, Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-Tieren wurden keine makro- und mikroskopischen Unterschiede beobachtet (Abb. 4.2.5).

5.4 „Knock In“-Mausmodelle zur Aufklärung einer möglichen funktionellen Signifikanz

Für „Knock In“- Mausmodelle konnte, mit Hilfe der hier gewonnenen Erkenntnisse, gezeigt werden, dass sie eine Möglichkeit bieten, die funktionelle Signifikanz der Connexin-Diversität zumindest ansatzweise zu klären. Die in der Literatur beschriebenen KI-Mausmodelle für Cx43 (PLUM et al., 2000; ZHENG-FISCHHÖFER et al., in press) zeigen, dass die untersuchten Connexine nicht ohne Funktionsverlust durch ein anderes ausgetauscht werden können. So kann Cx43 zwar von Cx32, Cx40 (PLUM et al., 2000) und Cx26 (diese Arbeit), nicht aber von Cx31 (ZHENG-FISCHHÖFER et al., in press), in einigen physiologischen Situationen ersetzt werden. Auch die Charakterisierung der Cx26KICx32-Mauslinie zeigt dies sehr eindrucksvoll. In diesem Beispiel geht es jedoch nicht nur um eine Ersetzbarkeit, sondern möglicherweise um den Nachweis einer funktionellen Signifikanz dieser beiden Gap Junction Proteine, obwohl oder gerade weil sie eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, die Bildung von heterotypischen Kanälen gezeigt wurde, und eine Stabilisierung des Cx26 Proteins durch Cx32 dargestellt werden konnte.

Zudem könnten die Cx26^{26/32}-Embryonen ein Hinweis darauf sein, dass die interzelluläre Kommunikation durch Gap Junctions in der Embryogenese funktionell notwendig ist, was bisher umstritten ist. Alternativ könnten Gap Junctions eine bis jetzt unbekannte Funktion *in vivo* haben (cf. HOUGHTON, 2005).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Expressionsmuster und biophysikalischen Eigenschaften der Connexine legen ein hohes Maß an funktioneller Spezialisierung nahe, demgegenüber stehen die Hinweise auf eine funktionelle Redundanz unter den Mitgliedern der Genfamilie. Der Ersatz der kodierenden Region eines Connexin Gens gegen die eines anderen Connexin Gens ermöglicht somit die Erforschung gemeinsamer und unterschiedlicher physiologischer Eigenschaften der beiden Gene.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, eine mögliche Ersetzbarkeit der beiden Connexine, Cx26 und Cx43, mit Hilfe zweier „Knock In“-Mauslinien zu untersuchen.

(1) Durch den gezielten Austausch der kodierenden Region von Cx26 gegen das, mit LoxP-Sequenzen flankierte, LacZ-Reportergen, konnte die Cx26 Expression allgemein und besonders in Zelltypen, in denen bislang ein Vorkommen von Cx26 umstritten war, geklärt werden. Die Cx26 Expression konnte durch das LacZ-Verteilungsmuster in einer Vielzahl bekannter Cx26 exprimierender Gewebe, wie Haut, Leber, Plazenta, Cochlea und Niere bestätigt werden. Im Gehirn wurde die LacZ/Cx26-Ausprägung nur in den Meningen gefunden, jedoch nicht in Astrozyten. Das LacZ-Reportergen konnte, durch Cre-Rekombinase vermittelt, aus dem Mausgenom deletiert werden, wodurch das Leseraster von Cx32 unter dem Promoter von Cx26 ausgeprägt werden konnte. Cx26-defiziente Mäuse sind homozygot embryonal letal. Erstaunlicherweise konnte Cx32 die Funktion von Cx26 in der Embryogenese schon in heterozygoten Cx26^{26/32}-Embryonen nicht ersetzen. Die Cx26^{26/32}-Embryonen entwickelten sich bis zur Geburt und zeigten phänotypische Anomalien, die von Tier zu Tier variierten. Die Organogenese wirkte in histologischen Analysen von Cx26^{26/32}-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen desorganisiert und rudimentär. Ungewöhnlicherweise wurde der Raum zwischen den Organen und unter der Haut durch vermeintlich mesenchymales Bindegewebe aufgefüllt.

(2) Der gezielte Ersatz der Cx43 kodierenden Region durch das Leseraster von Cx26 führte hingegen zur Geburt lebensfähiger heterozygoter (Cx43^{43/26}) und homozygoter (Cx43^{26/26}) Mäuse. Heterozygote Cx43^{43/26}-Weibchen konnten ihren Nachwuchs nur ungenügend ernähren. Eine gestörte Morphogenese des Herzens, wie für homozygot Cx43-defiziente Mäuse beschrieben, wurde nicht beobachtet. Die Elektrokardiogramme der Cx43^{43/26}- und Cx43^{26/26}-Tiere unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollen. Eine Keimzelldefizienz wurde sowohl bei Cx43^{26/26}-Männchen als auch bei Cx43^{26/26}-Weibchen beobachtet, was eine Infertilität zur Folge hatte. Analysen des follikel-stimulierenden Hormons (FSH) ließen einen primären, gonadalen Effekt vermuten. Außerdem zeigten die homozygoten Tiere ein postnatal reduziertes Wachstum.

Einerseits zeigen diese Ergebnisse eine funktionelle Redundanz unter den Mitgliedern der Connexin-Genfamilie. Andererseits können bestimmte Funktionen Gap Junction vermittelter interzellulärer Kommunikation anscheinend nur von bestimmten Connexinen vermittelt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAM, M., Sandri, C., and Abert, K. (1979)** Freeze-etch study of the teleostean pituitary, *Cell Tissue Res.* 199: 397-407
- ACKERT, C.L., Gittens, J.E., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., and Kidder, G.M. (2001)** Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 233: 258-270
- ALTEVOGT, B.M., and PAUL, D.L. (2004)** Four classes of intercellular channels between glia cells in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 24: 4313-4323
- ALTEVOGT, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Scherer, S.S. and Paul, D.L. (2002)** Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 22: 6458-6470
- ALVAREZ-MAUBECIN, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J.T., and Van Bockstaele, E.J. (2000)** Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* 20: 4091-4098
- ALVES, L.A., Campos de Carvalho, A.C., Cirne Lima, E.O., Rocha e Souza, C.M., Dardenne, M., Spray, D.C., and Savino, W. (1995).** Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur. J. Immunol.* 25: 431-437
- ANZINI, P., Neuberg, D.H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U., and Martini, R. (1997)** Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J. Neurosci.* 17: 4545-4551
- AUSUBEL, F.M., Brent, A., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.A., Smith, J.A., and Struhl, K. (1989-2001)** Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- BAO, X., Chen, Y., Reuss, L., and Altenberg, G.A. (2004)** Functional expression in *Xenopus* oocytes of gap-junction hemichannels formed by a cysteine-less connexin43. *J. Biol. Chem.* 279: 9689–9692
- BARRIO, L.C., Capel, J., Jarillo, J.A., Castro, C., and Revilla, A. (1997)** Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 73: 757-769
- BELLAIRS, R. (1986)** The primitive streak. *Anat. Embryol (Berl)* 174: 1-14
- BERGA, S.E. (1984)** Electrical potentials and cell-to-cell dye movement in mouse mammary gland during lactation. *Am. J. Physiol.* 247: C20-C25
- BERTHOUD, V.M., Ivanij, V., Garcia, A.M., and Sáez, J.C. (1992)** Connexins and glucagons receptors during development of the rat hepatic acinus. *Am. J. Physiol.* 263: G650-G658
- BEYER, E.C., Paul, D.L., and Goodenough D.A. (1994)** Cx43: A protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *Cell Biol.* 105: 2621–2629
- BIRNBOIM, H.C., and DOLY, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523
- BITTMAN, K., Becker, D.L., Cicirata, F., and Parnavelas, J.G. (2002)** Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 443: 201-212
- BOHNEN, J.S.S. (2003)** Versuche zum Ersatz der kodierenden Region des Connexin43 Gens durch diejenige des Connexin26 Gens in transgenen Mäusen. Diplomarbeit, Universität Bonn

- BORNSTEIN, P.**, Walsh, V., Tullis, J., Stainbrook, E., Bateman, J.F., and Hormuzdi, S.G. (2002) The globular domain of the proalpha 1(I) N-propeptide is not required for secretion, processing by procollagen N-proteinase, or fibrillogenesis of type I collagen in mice. *J. Biol. Chem.* 277: 2605-2613
- BRINK, P.**, Cronin, K.K., Banach, K., Peterson, E., Westphale, E.M., Seul, K.H., Ramanan, S.V., and Beyer E.C. (1997) Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am. J. Physiol.* 273: C1386–C1396
- BRITZ-CUNNINGHAM, S.H.**, Shah, M.M., Zuppan, C.W., Fletcher, W.H. (1995) Mutations of the connexin43 gap junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* 332: 1323-1329
- BRUZZONE, R.**, Hormuzdi, S.G., Barbe, M., Herb, A., and Monyer H. (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *PNAS* 100: 13644–13649
- BRY, C.**, Maass, K., Miyoshi, K., Willecke, K., Ott, T., Robinson, G.W., and Henninghausen, L. (2004) Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. *Dev. Biol.* 267: 418-429
- BUCHHOLZ, F.**, Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res.* 24: 3118-3119
- BUCHHOLZ, F.**, Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 16: 657-662
- BUKAUSKAS, F.F.**, Elfgang, C., Willecke, K., and Weingart, R. (1995) Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers Arch.* 429: 870-872
- BUNIELLO, A.**, Montanaro, D., Volinia, S., Gasparini, P., and Marigo, V. (2004) An expression atlas of connexin genes in the mouse. *Genomics* 83: 812-820
- CANO, A.**, Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2: 76-83
- CASCIO, M.**, Kumar, N.M., Safarik, R., and Gilula, N.B. (1995) Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. *J. Biol. Chem.* 270: 18643–18648
- CASTRO, C.H.**, Stains, J.P., Sheikh, S., Szejnfeld, V.L., Willecke, K., Theis, M., and Civitelli, R. (2003). Development of mice with osteoblast-specific connexin43 gene deletion. *Cell Commun. Adhes.* 10: 445-450
- CHANG, M.**, Werner, R., and Dahl, G. (1996) A role for an inhibitory connexin in testis? *Dev. Biol.* 175: 50-56
- CHOMCZYNSKI, P.**, and SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- COHEN-SALMON, M.**, Ott, T., Michel, V., Hardelin, J.P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D.C., Wangemann, P., Willecke, K., and Petit, C. (2002) Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelia gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* 12: 1106-1111
- CONNORS, B.W.**, and Long, M.A. (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 27: 393–418
- DASGUPTA, C.**, Martinez, A.M., Zuppan, C.W., Shah, M.M., Bailey, L.L., and Fletcher, W.H. (2001) Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mutat. Res.* 479: 173-186

DE SOUSA, P.A., Valdimarsson, G., Nicholson, B.J., and Kidder, G.M. (1993) Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117: 1355-1367

DE ZEEUW, C.I., Chorev, E., Devor, A., Manor, Y., Van Der Giessen, R.S., De Jeu, M.T., Hoogenraad, C.C., Bijman, J., Ruigrok, T.J., French, D., ad Jaarsma, P., Kistler, W.M., Meier, C., Petrasch-Pawez, E., Dermietzel, R., Söhl, G., Güldenagel, M., and Y. Yarom, (2003) Deformation of network connectivity in the inferior olive of connexin 36-deficient mice is compensated by morphological and electrophysiological changes at the single neuron level. *J. Neurosci.* 23: 4700–4711

DELMAR, M. (2002) Connexin diversity: discriminating the message. *Circ. Res.* 26: 85–86

DELMAR, M., Coombs, W., Sorgen, P., Duffy, H.S., and Taffet, S.M., (2004) Structural bases for the chemical regulation of connexin43 channels. *Cardiovas. Res.* 62:268–175

DEMEYTS, P., and HANOUNE, J. (1982) Plasma membrane receptors and function. In: Arias, I.M., Popper, H., Schachter D., Shafritz D.A. eds. *The liver: biology and pathobiology*. New York: Raven Press, 551-580

DENK, H., and Franke, W.W. (1982) Cytoskeletal filaments, in: *The Liver: Biology and Pathobiology* (J.M. Arias, H. Popper, D. Schlachter, and D.A. Shafritz, eds.), Raven Press, New York

DERMIETZEL, R., and SPRAY, D.C. (1992) Gap junctions in the brain: where, what type, how many, and why? *Trends Neurosci.* 16: 185-192

DERMIETZEL, R., Hwang, T.K., and Spray, D.C. (1990) The gap junction family: structure, function and chemistry, *Anat. Embryol.* 182: 517-528

DERMIETZEL, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V., Spray, D.C., and Willecke, K. (1989) Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10148-10152

DRENCKHAHN, D., und Zenker, W., **Benninghoff Anatomie**: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban & Schwarzenberg

DUFFY, H.S., Sorgen, P.L., Girvin, M.E., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., and Spray, D.C. (2002) pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 277: 36706–36714

EBIHARA, L., Liu, X., and Pal, J.D., (2003) Effect of external magnesium and calcium on human connexin46 hemichannels. *Biophys.* 84: 277–286

EDE, D.A., Hinchliffe, J.R., and Balls, M., editors. (1977) *Vertebrate limb and somite morphogenesis*. Cambridge London: University Press. 498 p.

ELFGANG, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F. and Willecke, K. (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *Journal of Cell Biology* 129: 805-817

EVANS, W.H., and MARTIN, P.E. (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* 19: 121-136

FALK, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M., and Gilula, N.B., (1997) Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* 16: 2703–2716

FILIPPOV, M.A., Hormuzdi, S.G., Fuchs, C., and Monyer, H. (2003) A reporter allele for investigating connexin26 gene expression in the mouse brain. *Eur. J. of Neuroscience* 18: 3183-3192

- FITZGERALD, D.J., Mesnil, M., and Oyamada, M. (1989)** Changes in gap junction protein (connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis. *J. Cell Biochem.* 41: 97-102
- FLETCHER, W.H., Anderson, N.C., and Everett, J.W. (1975)** Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland: an in vivo and in vitro study. *J. Cell Biol.* 67: 469-476
- FOOTE, C.I., Zhou, L., Zhu, X., and Nicholson, B.J., (1998)** The pattern of disulfide linkage in extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140: 1187-1197
- FRANKLIN, K.B.J., und Paxinos, G. (1997)** *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, USA
- FRASER, S.E., Green, C.R., Bode, H.R., Gilula, N.B. (1987)** Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science* 23: 49-55.
- FRENZ, C.M., and VAN DE WATER, T.R. (2000)** Immunolocalization of connexin 26 in the developing mouse cochlea. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32: 172-180
- GABRIEL, H.D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., and Willecke, K. (1998)** Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140: 1453-1461
- GAETTA, G., Deernick, T.J., Adams, S.R., Bouver, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., and Ellisman, M.H., (2002)** Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296: 503-507
- GIAUME, C., Fromaget, C., el Aoumar, A., Cordier, J., Glowinski, J., and Gros, D. (1991)** Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron*. 6: 133-143
- GIEPMANS, B.N., and MOOLENAAR, W.H. (1998)** The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* 8: 931-934
- GIEPMANS, B.N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., and Moolenaar, W.H. (2001)** Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* 11: 1364-1368
- GILULA, N.B. (1987)** Topology of gap junction protein and channel function. *Ciba Found Symp* 125: 128-139
- GILULA, N.B., Epstein, M.L., and Beers, W.H. (1978)** Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex, *J. Cell Biol.* 78: 58-75
- GITTENS, J.E., Mhawi, A.A., Lidington, D., Ouellette, Y., and Kidder, G.M. (2003).** Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284: C880-C887
- GOLDBERG, G.S., Lampe, P.D., Sheedy, D., Nicholson, B.J., and Naus, C.C. (1998)** Direct isolation and analysis of endogenous transjunctional ADP from Cx43 transfected C6 glioma cells. *Exp. Cell Res.* 239: 82-92
- GOLIGER, J.A., and PAUL, D.L. (1995)** Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol. Biol. Cell* 6: 1491-1501
- GONG, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., and Gilula, N.B. (1997)** Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* 91: 833-843
- GOODENOUGH D.A., and PAUL D.L. (2003)** Beyond the gap: functions of unpaired connexonchannels. *Nature Reviews-Molecular Cell Biology* 4: 1-10
- GOODENOUGH, D.A., and REVEL, J.-P. (1970)** A fine structural analysis of intercellular junctions in rat liver, *J. Cell Biol.* 45: 272-290

- GRANOT, I., and Dekel, N. (1998)** Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. *Hum. Reprod.* 13 Suppl 4:85-97., 85-97
- GÜLDENAGEL, M., Ammermuller, J., Feigenspan, A., Teubner, B., Degen, J., Söhl, G., Willecke, K., and Weiler, R. (2001)** Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *Journal of Neuroscience* 21: 6036-6044
- GUMUCIO, J.J., and MILLER, D.L. (1981)** Functional implications of liver cell heterogeneity, *Gastroenterology* 80: 393-403
- GUMUCIO, J.J., and MILLER, D.L. (1982)** Liver cell heterogeneity, in: *The Liver: Biology and Pathobiology* (J.M. Arias, H. Popper, D. Schlachter, and D.A. Shafritz, eds.), Raven Press, New York
- HAEFLIGER, J.A., Nicod, P., and Meda, P. (2004)** Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc.Res.* 62: 345-356
- HAGENDORFF, A., Schumacher, B., Kirchhoff, S., Lüderitz, B., and Willecke, K., (1999)** Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation.* 99:1508-1515
- HALL, J.E., Zampighi, G.A., and Davis, R.M. (1993)** Gap junctions. Amsterdam: Elsevier.
- HANAHAN, K. (1983)** Studies for transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- HARRIS, A.L. (2002)** Voltage-sensing and substrate rectification: moving parts of connexin channels. *J. Gen. Physiol.* 119: 165-169
- HAY, E.D. (1968)** Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo, In: *Fleischmajer, R., Billingham, R.E., editors. Epithelial-mesenchymal interactions.* Baltimore: Williams and Wilkins. 31-55
- HAY, E.D. (2005)** The mesenchymale cell, its role in the embryo, and the remarkable signalling mechanisms that create it. *Dev. Dynamics* 233: 706-720
- HAYDON, P.G. (2001)** GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 185-193
- HENDERSON, D., Eibl, H., and Weber, K. (1979)** Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions, *J. Mol. Biol.* 132: 193-218
- HENNEMANN, H., Dahl, E., White, J.B., Schwarz, H.J., Lalley, P.A., Chang, S., Nicholson, B.J., and Willecke, K. (1992)** Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267: 17225-17233
- HENNEMANN, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B., and Willecke, K. (1992)** Molecular cloning of mouse connexin26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur. J. Cell Biol.* 58: 81-89
- HENNINGHAUSEN, L., and ROBINSON, G.W. (1998)** Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev.* 12: 449-455
- HERTZBERG, E.L., and GILULA, N.B. (1979)** Isolation and characterization of gap junctions from rat liver, *J. Biol. Chem.* 254: 2138-2147
- HEYNKES, R., Kozjek, G., Traub, O., and Willecke, K. (1986)** Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein. *FEBS Lett.* 205: 56-60

- HOGAN, B., Beddington, F., Costantini, F., and Lacey, E. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- HOMBACH, S., Jannsen-Bienhold, U., Söhl, G., Schubert, T., Bussow, H., Ott, T., Weiler, R., and Willecke, K. (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 19: 2633-2640
- HOMBACH, Sonja (2004) *Erzeugung und Charakterisierung von Knock-In Reportergergen-Mäusen des Connexin57 und Versuche zur Herstellung spezifischer Antikörper*, Doktorarbeit, Universität Bonn
- HOMMA, N., Alvarado, J.L., Coombs, W., Stergiopoulos, K., Taffet, S.M., Lau, A.F., and Delmar, M. (1998) A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ. Res.* 83: 27–32
- HORMUZDI, S.G., Penttinen, R., Jaenisch, R., and Bornstein, P. (1998). A gene-targeting approach identifies a function for the first intron in expression of the alpha1(I) collagen gene. *Mol. Cell Biol.* 18: 3368-3375
- HOTZ-WAGENBLATT, A. and Shalloway (1993) Gap junction communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncog.*, 4:541–558
- HOUGHTON, F.D. (2005) Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction* 129: 129-135 (Review)
- HOUGHTON, F.D., Thönnissen, E., Kidder, G.M., Naus, C.C.G., Willecke, K., and Winterhager, E. (1999) Doubly mutant mice, deficient in connexin32 and -43, show normal prenatal development of organs where the two gap junction proteins are expressed in the same cells. *Developmental Genetics* 24: 5-12
- HUANG, G.Y., Wessels, A., Smith, B.R., Linask, K.K., Ewart, J.L., and Lo, C.W. (1998) Alterations in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. *Dev. Biol.* 198: 32-44
- IWAI, M., Harada, Y., Muramatsu, A., Tanaka, S., Mori, T., Okanoue, T., Katoh, F., Ohkusa, T., and Kashima, K. (2000) Development of gap junctional channels and intercellular communication in rat liver during ontogenesis. *J. Hepatol.* 32: 11-18
- JORDAN, K., Chodock, R., Hand, A.R., and Laird, D.W. (2001) The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell Sci.* 114: 763–773
- JUNEJA, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C. and Kidder, G.M. (1999) Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* 60: 1263-1270
- JUNGERMAN, K., and KATZ, K. (1989) Functional specialization of different hepatocyte populations, *Physiol. Rev.* 59: 708-764
- JUNGERMANN, K., and SASSE, D. (1978) Heterogeneity of liver parenchymal cells, *Trends Biochem. Sci.* 3: 198-202
- KALMA, Y., Granot, I., Galiani, D., Barash, A., and Dekel, N. (2004) Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology* 145: 1617-1624
- KANDEL, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (1995) *Principles of Neural Science*. Elsevier Science Publishing Co., New York
- KAUFMANN, M.H. (1992) *The atlas of mouse development*. Academic Press
- KELSELL, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., and Leigh, I.M. (1997) Connexin26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineuronal deafness. *Nature* 387: 80-83
- KELSELL, D.P., Wilgoss, A.L., Richard, G., Stevens, H.P., Munro, C.S., and Leigh, I.M. (2000) Connexin mutations associated with *inhibinopen* keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 469-472

- KIBAR, Z., Der Kaloustian, V.M., Brais, B., Hani, V., Fraser, F.C., and Rouleau, G.A. (1996)** The gene responsible for Clouston hidrotic ectodermal dysplasia maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Hum. Mol. Genet.* 5: 543-547
- KIDDER, G.M., and MHAWI, A.A. (2002).** Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123: 613-620
- KIKUCHI, T., Kimura, R.S., Paul, D.L., and Adams, J.C. (1995)** Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 191: 101-118
- KIKUCHI, T., Kimura, R.S., Paul, D.L., Takasaka, T., and Adams, J.C. (2000)** Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32: 163-166
- KOJIMA, T., Mitaka, T., Shibata, Y., and Mochizuki, Y. (1995)** Induction and regulation of connexin26 by α -inhibin in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J. Cell Sci.* 108: 2771-2780
- KRENACS, T., van Dartel, M., Lindhout, E., and Rosendaal, M. (1997)** Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 27: 1489-1497
- KRETZ, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Willecke, K., and Ott, T. (2003).** Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J. Cell Sci.* 116: 3443-3452
- KREUZBERG, M.M., Söhl, G., Kim, J.S., Verselis, V.K., Willecke, K., and Bukauskas, F.F. (2005)** Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ. Res.* 96: 1169-1177
- KRUTOVSKIKH, V.A., Piccoli, C., Yamasaki, H., and Yamasaki, H. (2002)** Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* 21: 1989-1999
- KÜHN, R., and SCHWENK, F. (1997)** Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* 9:183-188
- KÜHNEL W. (1989)** Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 7. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart
- KUMAI, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. (2000)** Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127: 3501-3512
- KUMAR, N.M., and GILULA, N.B. (1986)** The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388
- KUMAR, T.R., Palapattu, G., Wang, P., Woodruff, T.K., Boime, I., Byrne, M.C., and Matzuk, M.M. (1999)** Transgenic models of study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. *Molecular Endocrinology* 13: 851-865
- KUNZELMANN, P., Schroder, W., Traub, O., Steinhauser, C., Dermietzel, R., and Willecke, K. (1999)** Late onset and increasing of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia.* 15: 111-119
- KWAK, B.R., van Veen, T.A.B., Analbers, L.J.S., and Jongsma, H.J. (1995)** TPA increases conductance but decreases permeability in neonatal rat cardiomyocyte gap junction channels. *Exp. Cell Res.* 220: 456-463
- LAEMMLI, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-686
- LAIRD, P.W., Zijderfeld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991)** Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19: 4293

- LALLEMAND, Y.,** Luria, V., Haffner-Krausz, R., und Lonai, P. **(1998)** Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res* 7: 105-112
- LAMPE, P.D.,** and LAU, A.F. **(2004)** The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 1171-1186
- LAMPE, P.D.,** TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., and Lau, A.F. **(2000)** Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 149: 1503–1512
- LASH, J,** Holtzer, S., and Holtzer, H. (1957) An experimental analysis of the development of the spinal column. VI. Aspects of cartilage induction. *Exp. Cell Res.* 13: 292-303
- LAUX-FENTON, W.T.,** Donaldson, P.J., Kistler, J., and Green, C.R. **(2003).** Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments. *Cornea* 22: 457-464
- LEVIN, M. (2002)** Isolation and Community: A Review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning. *Journal of Membrane Biology* 185: 177-192
- LEWANDOSKI, M. (2001)** Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2: 743-755
- LI, H.,** Liu, T.-F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G.S., Lampe, P.D., and Johnson, R.G., **(1996)** Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J. Cell Biol.* 134: 1019–1030
- LIU, S.,** Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M.L., and Jalife, J. (1993) A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intercellular acidification: The carboxy tail length. *Biophys. J.* 64: 1422–1433
- Lo, C. (1996)** The role of gap junction membrane channels in development. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28: 379–385
- Lo, C.W. (1999)** Genes, gene knockouts and mutations in the analysis of gap junctions. *Dev. Genet.* 24: 1-4
- Lo, C.W.,** Waldo K.L., and Kirby M.L. **(1999)** Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells. *Trends Cardiovasc. Med.* 9: 63-69
- LOEWENSTEIN, W.R.,** and ROSE, B. **(1992)** The cell-cell channel in the control of growth, *Semin. Cell Biol.* 3: 59–79
- MAAß, K.,** Ghanem, A., Kim, J.-S., Saathoff, M., Urschel, S., Kirfel, G., Grümmer, R., Kretz, M., Lewalter, T., Tiemann, K., Winterhager, E., Herzog, V., and Willecke, K. **(2004)** Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of Cx43. *Molecular Biology of the Cell* 15: 4597-4608
- MAAß, Karen (2004)** Gezielte Erzeugung und Analyse transgener Mäuse zur Aufklärung und Funktion der C-terminalen Domäne des Cx43 Proteins *in vivo*, Doktorarbeit, Universität Bonn
- MAGIN, T.M.,** McWhir, J., and Melton, D.W. (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic. Acids. Res.* 20: 3795-3796
- MANJUNATH, C.K.,** Goings, G.E., Page, E. **(1984)** Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am.J.Physiol* 246: H865-H875
- MANLEY, N.R.,** Barrow, J.R., Zhang, T., and Capecchi, M.R. **(2001)** Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Dev. Biol.* 237: 130-144
- MANTHEY, D.,** Bukauskas, F., Lee, C.G., Kozak, C.A., and Willecke, K. **(1999)** Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274: 14716-14723

- MAXEINER, S.,** Krüger, O., Schilling, K., Traub, O., Urschel, S., and Willecke, K. (2003) Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119: 689-700
- McDEVITT, M.A.,** Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., Yang, H., and Orkin, S.H. (1997) A 'knockdown' mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 6781-6785
- MEDA, P.,** Pepper, M.S., Traub, O., Willecke, K., Gros, D., Beyer, E., Nicholson, B., Paul, D., and Orci, L. (1993) Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* 133: 2371-2378
- MÈGE, R.M.,** Matsuzaki, F., Gallin, W.J., Goldberg, J.I., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1988) Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNA for chicken cell adhesion molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7274-7278
- MEIER, C.,** Petrasch-Parwez, E., Habbes, H.W., Teubner, B., Güldenager, M., Degen, J., Söhl, G., Willecke, K., and Dermietzel, R. (2002) Immunohistochemical detection of the neuronal connexin36 in the mouse central nervous system in comparison to connexin36-deficient tissues. *Histochem. Cell Biol.* 117: 461-471
- MENICHELLA, D.M.,** Goodenough, D.A., Sirkowski, E., Scherer, S.S., and Paul D.L. (2003) Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 23: 5963-5973
- MERCIER, F.,** and HATTON, G.I. (2001) Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *J. Comp. Neurol.* 431: 88-104
- METZ, J.,** Aoki, A., and Forssmann, W.G. (1978) Studies on the ultrastructure and permeability of the hemotrichorial placenta. I. Intercellular junctions of layer I and tracer administration into the maternal compartment. *Cell Tissue Res.* 192: 391-407
- METZ, J.,** Aoki, A., Merlo, M., and Forsmann, W.G. (1977) Morphological alterations and functional changes of interhepatocellular junctions induced by bile duct ligation. *Cell Tissue Res.* 182: 299-310
- METZ, W.,** and Forssmann, W.G. (1980) Innervation of the liver in guinea pig and rat, *Anat. Embryol.* 160: 239-252
- MITCHELL, J.A.,** and LYE, S.J. (2001). Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun. Adhes.* 8: 299-302
- MOORE, R.C.,** Redhead, N.J., Selfridge, J., Hope, J., Manson, J.C., and Melton, D.W. (1995) Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Biotechnology N.Y.* 13: 999-1004
- MORENO, A.P.,** Sáez, J.C., Fisherman, G.I., and Spray, D.C. (1994) Human connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ. Res.* 74: 1050-1057
- MORLEY, G.E.,** Taffet, S.M., and Delmar, M. (1996) Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* 70: 1294-1302
- MÜLLER und HASSEL,** Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tier, 3. Auflage
- MULLIS, K.B.,** and FALOONA, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- MURAKAMI, S.,** Muramatsu, T., and Shimono, M. (2001) Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat. Embryol. (Berl)* 203: 367-374

- MUSIL, L.S., und Goodenough, D.A. (1993)** Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077
- MYSTKOWSKA, E.T., Ozdzinski, W., and Niemierko, A. (1979)** Factors regulating the degree and extent of experimental chimaerism in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 51 : 217-225
- NADARAJAH, B., Jones, A.M., Evans, W.H., and Parnavelas, J.G. (1997)** Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J. Neurosci.* 17: 3096-3111
- NAGY, A., Gertsenstein, M., Vinterstein, K., and Behringer, R. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003**
- NAGY, J.I., Li, X., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W.A., Yasumura, T., and Rash, J.E. (2001)** Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J. Comp. Neurol.* 441: 302-323
- NAGY, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A., and Stelmack, G.L. (1999)** Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88: 447-468
- NEDERGAARD, M. (1994)** Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263: 1768-1771
- NELLES, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., Jungermann, K., and Zielasek, J. (1996)** Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *PNAS* 93: 9565-9570
- NEUHAUS, I.M., Dahl, G., und Werner, R. (1995)** Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene* 158: 257-262
- NICHOLSON, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., and Revel, J.-P. (1987)** Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 329: 732-734
- NICHOLSON, S.M., and BRUZZONE, R. (1997)** Gap junctions: getting the message through. *Current Biology* 7: R340-R344
- NIELSEN, P.A., and KUMAR, N.M. (2003)** Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9. *FEBS Lett.* 540: 151-156
- NIESSEN, H., Harz, H., Bedner, P., Krämer, K., und Willecke, K. (2000)** Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Sci.* 113: 1365-1372
- NISHIMORI, K., Young, L.J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T.R., and Matzuk, M.M. (1996)** Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behaviour. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 11699-11704
- OKUMA, A., Kuraoka, A., Iida, H., Inai, T., Wasano K., and Shibata, Y. (1996).** Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 107 : 255-264
- OVIEDO-ORTA, E., and HOWARD, E.W. (2004).** Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta* 1662: 102-112
- PAUL, D.L. (1995)** New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 665-672
- PAUL, D.L. (1986)** Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *The Journal of Cell Biology* 103: 123-134

- PAUL, D.L., Bruzzone, R., Haefliger, J.-A., and Gimlich, R.L. (1993)** Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol. Biol. Cell.* 4: 7–20
- PAZNEKAS, W.A., Boyadjiev, S.A., Shapiro, R.E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C.E., Innis, J.W., Dinulos, M.B., Christian, C., Hannibal, M.C., and Jabs, E.W. (2003)** Connexin43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 408–418
- PELLETIER, R.M. (1995)** The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J. Androl.* 16: 400–409
- PERKINS, G.A., Goodenough, D.A., and Sosinsky, G.E. (1998)** Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30° rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277: 171–177
- PFEFFER, S.R., and Rothmann, J.E. (1987)** Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 829–852
- PHELAN, P., and STARICH, T.A. (2001)** Innexins get into the gap. *Bioessays* 23: 388–396.
- PITTS, J.D., and SIMMS, J.W. (1977)** Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not macromolecules. *Exp. Cell Res.*, 104: 153–163
- PLUM, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J.-S., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., and Willecke, K. (2000)** Unique and shared functions of different connexins in mice. *Current Biology* 10: 1083–1091
- PLUM, A., Winterhager, E., Pesch, J., Lautermann, J., Hallas, G., Rosentreter, B., Traub, O., Herberhold, C., and Willecke, K. (2001)** Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Developmental Biology* 231: 334–347
- PLUM, Achim (1999)** Untersuchungen zur Regulation, Funktion und Austauschbarkeit verschiedener Connexingene in der Maus. Doktorarbeit, Universität Bonn
- POZZI, A., Risek, B., Kiang, D.T., Gilula, N.B., and Kumar, N.M. (1995)** Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. *Exp. Cell Res.* 220: 212–219
- QUERINGS, Silvia (2003)** Austausch der kodierenden Region des Connexin 26-Gens durch Connexin 30-DNS in embryonalen Stammzellen der Maus. Diplomarbeit, Universität Bonn
- RAHMAN, S., and EVANS, W.H. (1991)** Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intermolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. *J. Cell Sci.* 100: 567–578
- RAHMAN, S., Carlile, G., and Evans, W.H. (1993)** Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 268: 1260–1265
- RAPPAPORT, A.M. (1976)** The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure, *Beitr. Pathol.* 157: 215–243
- RASH, J.E., Yasumura, T., Davidson, K.G., Furman, C.S., Dudek, F.E., and Nagy, J.I. (2001)** Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun. Adhes.* 8: 315–320
- RASH, J.E., Yasumura, T., Dudek, F.E., and Nagy, J.I. (2001)** Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J. Neurosci.* 21: 1983–2000

REAUME, A.G., De Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., and Rossant, J. (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834

Regulation of Hepatic Metabolism: Intra- and Intercellular Compartmentation, **1986** (Edited by Thurman, R.G., Kauffman, F.C., and Jungermann K.), Plenum Press, New York

REVEL, J.P., and KARNOVSKY, M.J. (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33: C7-C12

RISEK, B., Klier, F.G., and Gilula, N.B. (1992) Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development. *Development* 116: 639-651

RISEK, B., Klier, F.G., and Gilula, N.B. (1994) Development regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Dev. Biol.* 164: 183-196

RISLEY, M.S., Tan, I.P., Roy, C., and Saez, J.C. (1992) Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 103: 81-96

ROBERTSON, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-448

ROBINSON, S.R., Hampson, E.C.G.M., Munro, M.V., and Vaney D.I. (1993) Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* 262:1072–1074

ROSCOE, W.A., Barr, K.J., Mhawi, A.A., Pomerantz, D.K., and Kidder, G.M. (2001). Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* 65: 829-838

ROSENBERG, E., Spray, D.C., and Reid, L.M. (1992) Differential expression of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes, *Eur. J. Cell Biol.* 59: 21-26

ROSENBERG, E., Spray, D.C., and Reid, L.M. (1992) Transcriptional and posttranscriptional control of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 59: 21-26

RUBIN, J.B., Greenwell, P., Spray, D.C., Campos de Carvalho, A.C., Rojkin, M., and Hertzberg, E.L. (1990) Expression of the gap junction protein connexin43 in fat-storing (Ito) cell clones correlates with maintenance of hepatocyte cell function in culture. *J. Cell Biol.* 111: 153a

RUSSELL, J.A., and LENG, G. (1998) Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J. Endocrinol.* 157: 343-359

SÁEZ, J.C., and LARUSSO, N.F. (1992) Intrahepatic bile duct epithelial cells are functionally coupled by connexin 43-enriched gap junctions. *Gastroenterology* 104: A983

SÁEZ, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martínez, A.D., and Beyer, E.C., (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Res.* 83: 1359–1400

SÁEZ, J.C., Connor, J.A., Spray, D.C. and Bennett, M.V.L. (1989) Hepatocytes gap junctions are permeable to the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 2708-2712

SÁEZ, J.C., Gregory, W.A., Watanabe, T., Dermietzel, R., Hertzberg, E.L., Ried, L., Bennett, M.V.L., and Spray, D.C. (1989) cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary cultures, *Am. J. Physiol.* 26: C1-C11

SÁEZ, J.C., Naim, A.C., Czernik, A.J., Spray, D.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P., and Bennett, M.V.L. (1990) Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 192: 263-273

- SAKAI, R.,** Elfgang, C., Vogel, R., Willecke, K., and Weingart, R. (2003) The electrical behaviour of rat connexin46 gap junction channels expressed in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch.* 446: 714-727
- SALOMON, D.,** Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J.H., and Meda, P. (1994) Topography of mammalian connexins in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 240-247
- SAMBROOK, J., and RUSSELL, D.W. (2001)** Molecular cloning: a laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHUBERT, A.L.,** Schubert, W., Spray, D.C., and Lisanti, M.P., (2003) Connexin family members target to lipid raft domains and interact with calveolin-1. *Biochemistry* 41: 5754–5764
- SCHWARZ, M.,** Wanke, I., Wulbrand, U., Moennikes, O., and Buchmann, A. (2003) Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol. Pathol.* 31: 99-102
- SESEKE, F.G.,** Gardeman, A., and Jungermann, K. (1992) Signal propagation via gap junctions, a key step in the regulation of liver metabolism by the sympathetic hepatic nerves. *FEBS Lett.* 301: 265-270
- SEVERS, N.J.,** Coppen, S.R., Dupont, E., Yeh, H.I., Ko, Y.S., and Matsushita, T. (2004). Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc.Res.* 62: 368-377
- SHIN, B.-C.,** Fujikura, K., Suzuki, T., Tanaka, S., and Takata, K. (1997) Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* 138: 3997-4004
- SHIN, B.-C.,** Suzuki, T., Matsuzaki, T., Tanaka, S., Kuraoka, A., Shibata, Y., and Takata, K. (1996) Immunolocalization of GLUT1 and connexin26 in the rat placenta. *Cell Tissue Re.* 285: 83-89
- SHIRASAWA, N.,** Mabuchi, Y., Sakuma, E., Horiuchi O., Yashiro, T., Kikuchi, M., Hashimoto, Y., Tsuruo, Y., Herbert, D.C., and Soji, T. (2004) Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: X. Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 278: 462-473
- SIMON, A.M.,** Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (1998) Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Current Biology* 8: 295-298
- SIMON, A.M.,** Goodenough, D.A., Li, E., and Paul, D.L. (1997) Female infertility in mice lacking connexin37. *Nature* 385: 525-529
- SIMPSON, I.,** Rose, B., and Loewenstein, W. R. (1977) Size limitation of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195: 294–296,
- SINGLE, F.N.,** Rozov, A., Burnashev, N., Zimmermann, F., Hanley, D.F., Forrest, D., Curran, T., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., and Seeburg, P.H. (2000) Dysfunctions in mice by NMDA receptor point mutations NR1 (N598Q) and NR1 (N598R), *J. Neurosci.* 20: 2558-2566
- SKERRETT, I.M.,** Aranowitz, J., Shin, J.H., Cymes, G., Kasperek, E., Cao, F.L., and Nicholson, B.J. (2002) Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junction channel. *J. Cell Biol.* 159: 349-360.
- SMITH, P.K.,** Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 79: 76–85
- SÖHL, G., and Willecke, K., (2003)** An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10:173–180
- SÖHL, G.,** Degen, J., Teubner, B., and Willecke, K. (1998) The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett* 428: 27-31

- SÖHL, G., Maxeiner, S., and Willecke, K. (2005)** Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 191-200
- SÖHL, G., Nielsen, P.A., Eiberger, J., und Willecke, K. (2003)** Expression Profiles of the Novel Human Connexin Genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 Differ from Their Putative Mouse Orthologues. *Cell Commun Adhes* 10: 27-36
- SÖHL, G., Theis, M., Hallas, G., Brambach, S., Dahl, E., Kidder, G., und Willecke, K. (2001)** A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp Cell Res* 266: 177-186
- SPRAY, D.C., Sáez, J.C., Hertzberg, E.L., and Dermietzel R. (1994)** Gap Junctions in Liver: Composition, Function, and Regulation, in: *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jokoby, W.B., Schachter D.A., and Shafritz, D.A. eds.), Third Edition, Raven Press, Ltd., New York
- STERGIOPOULOS, K., Alvarado, J.L., Mastroianni, M., Ekvitorin, J.F., Taffet, S.M., und Delmar, M. (1999)** Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ. Res.* 84: 1144-1155
- STERN, C. (2004)** From cells to embryo. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 880 p.
- TAKEDA, A. Kanoh, M., Shimazu, T., and Takeuchi, N. (1988)** Monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the 27-kDa gap junction protein from rat liver. *J. Biochem.* 104: 901-907
- TALLQUIST, M.D., and SORIANO, P. (2000)** Epiblast-restricted cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* 26: 113-115
- TAN, I.P., Roy, C., Sáez, J.C., Paul, D.L., and Risley, M.S. (1996)** Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol. Reprod.* 54: 1300-1310
- TAWADROS, T., Meda, P., Leisinger, H.J., Waeber, G. and Haefliger, J.A. (2001)** Connexin26 is regulated in rat urothelium by the scaffold protein IB1/JIP-1. *Cell Commun. Adhes.* 8: 303-306
- TEMME, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K. (1997)** High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Current Biology* 7: 713-716
- TEUBNER, B., Degen, J., Söhl, G., Güldenagel, M., Bukauskas, F.F., Trexler, E.B., Verselis, V.K., De Zeeuw, C.I., Lee, C.G., Kozak, C.A., Petrasch-Parwez, E., Dermietzel, R., and Willecke, K. (2000)** Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* 176 : 249-262
- TEUBNER, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Söhl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J.P. et al. (2003)** Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Human Molecular Genetics* 12: 13-21
- TEUBNER, B., Odermatt, B., Güldenagel, M., Söhl, G., Degen, J., Bukauskas, F., Kronengold, J., Verselis, V.K., Jung, Y.T., Kozak, C.A., Schilling, K., and Willecke, K. (2001)** Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 21: 1117-1126
- THEIS, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., Frisch, C., Söhl, G., Teubner, B., Euwens, C., Huston, J., Steinhäuser, C., Messing, A., Heinemann, U., and Willecke, K. (2003).** Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J.Neurosci.* 23: 766-776
- THEIS, M., Magin, T.M., Plum, A., and Willecke, K. (2000)** General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods* 20: 205-218

THEIS, M., Mas, C., Döring, B., Degen, J., Brink, C., Caille, D., Charollais, A., Krüger, O., Plum, A., Nepote, V., Herrera, P., Meda, P., and Willecke, K. (2004) Replacement by a lacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp. Cell Res.* 294: 18-29

TOYOFUKU, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M., (1998) Direct association of gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273:1 2725–12731

TRAUB, O., Druge, P.M., and Willecke, K. (1983) Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membrane regeneration liver after partial hepatectomy or cholestasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 755-759

TRAUB, O., Hertlein, B., Kasper, M., Eckert, R., Krisciukaitis, A., Hülser, D., and Willecke, K. (1998) Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 77: 313-322

TRAUB, O., Jansen-Timmen, U., Druge, P., Dermietzel, R., and Willecke, K (1982) Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cell Biochem.* 19: 27-44

TRAUB, O., Look, J., Dermietzel, R., Brümmer, F., Hülser, D., and Willecke, K. (1989) Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction protein in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* 108: 1039-1051

TRELSTAD, R.L., Hay, E.D., and Fujiwara, K. (1982) Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 16: 78-106

TRELSTAD, R.L., Hay, E.D., and Revel, J.-P. (1967) Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* 16: 78-106

TREXLER, E.B., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V.L., Bargiello, T.A., and Verselis, V.K. (1999) Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J. Gen. Physiol.* 113: 721–742

TURIN, L., and WARNER, A. (1977) Carbon dioxide reversibly abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryo. *Nature* 270: 56–57

UNWIN, P.N.T., and ENNIS, P.D. (1983) Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J. Cell Biol.* 97: 1459–1466

UNWIN, P.N.T., and Ennis, P.D. (1984) Two configurations of a channel-forming membrane protein, *Nature* 307: 609-613

UNWIN, P.N.T., and Zampighi, G. (1980) Structure of the junction between communicating cells, *Nature* 283: 545-549

VALDIMARSSON, G., and KIDDER, G.M. (1995) Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. *Journal of Cell Science* 108: 1715-1722

VALIUNAS, V., Manthey, D., Vogel, R., Willecke, K., and Weingart, R. (1999) Biophysical properties of mouse connexin30 gap junction channels studied in transfected human HeLa cells. *J. Physiol.* 519: 631-644

VAN VEEN, T.A., van Rijen, H.V., and Jongsma, H.J. (2001) Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovas. Res.* 46: 496–510

VENANCE, L., Rozov, A., Blatow, M., Burnashev, N., Feldmeyer, D., and Monyer, H. (2000) Connexin expression in electrically coupled postnatal brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10260-10265

VERBOV, J. (1987) Palmoplantar keratoderma, deafness and atopy. *Br. J. Dermatol.* 116: 881-882

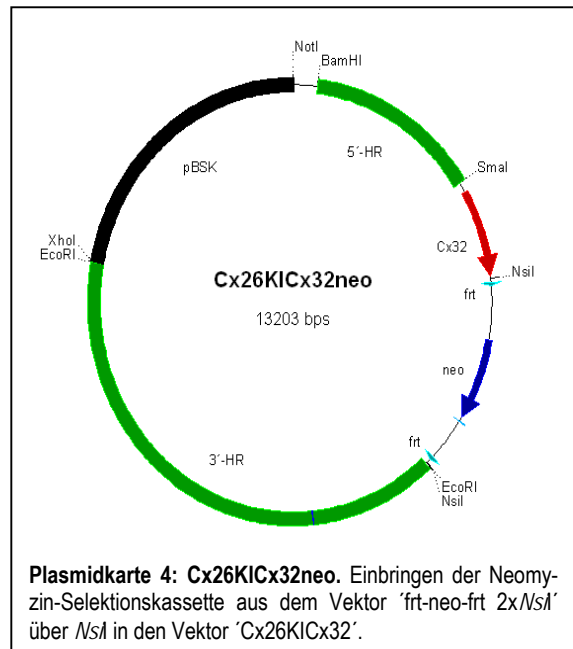
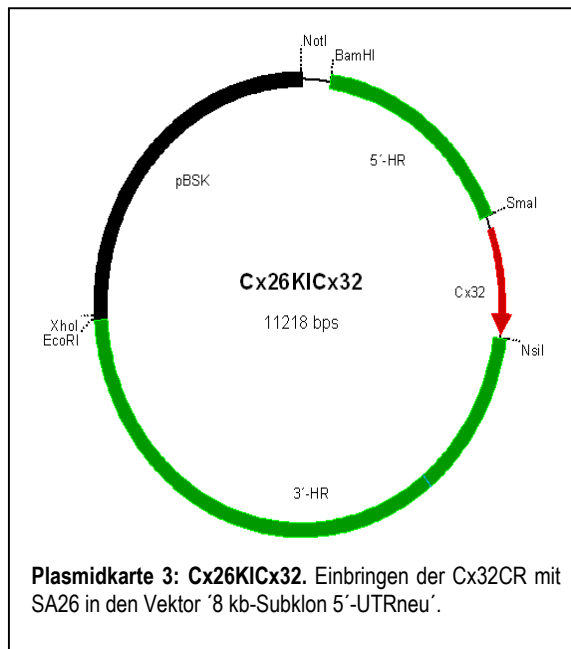
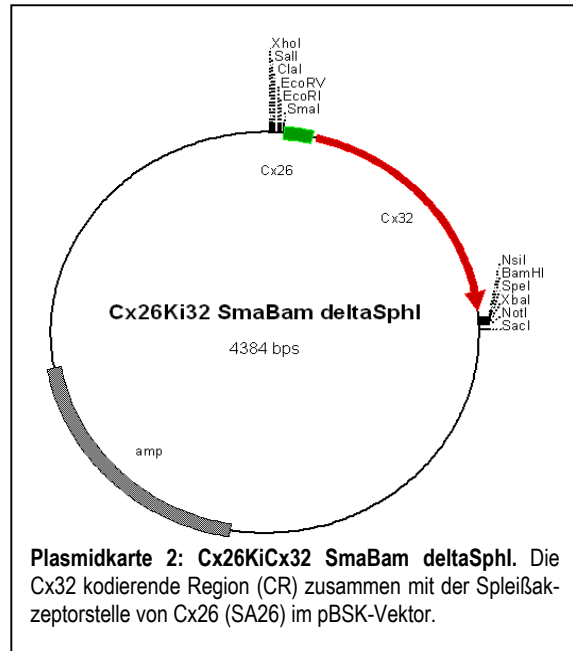
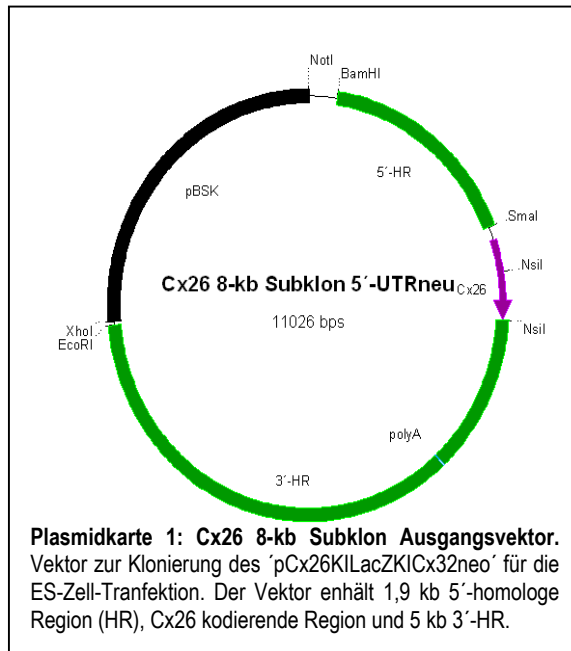
VERSELIS, V.K., Ginter, C.S., and Bargiello, T.A. (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368: 348–351

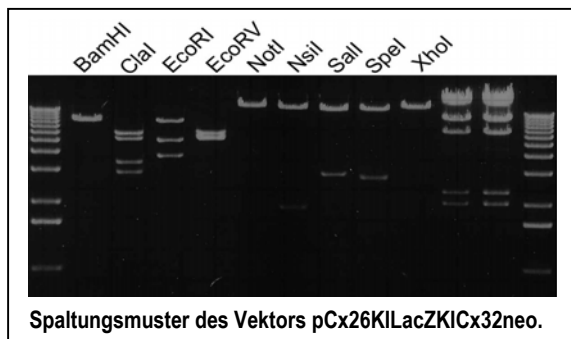
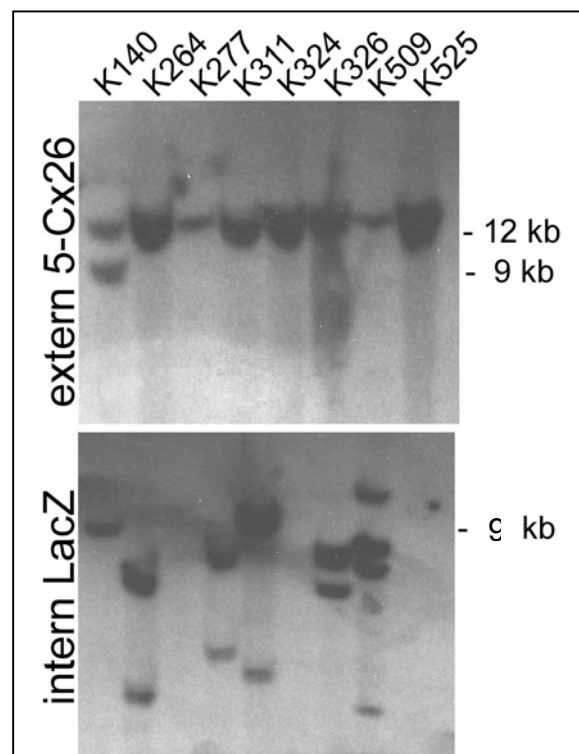
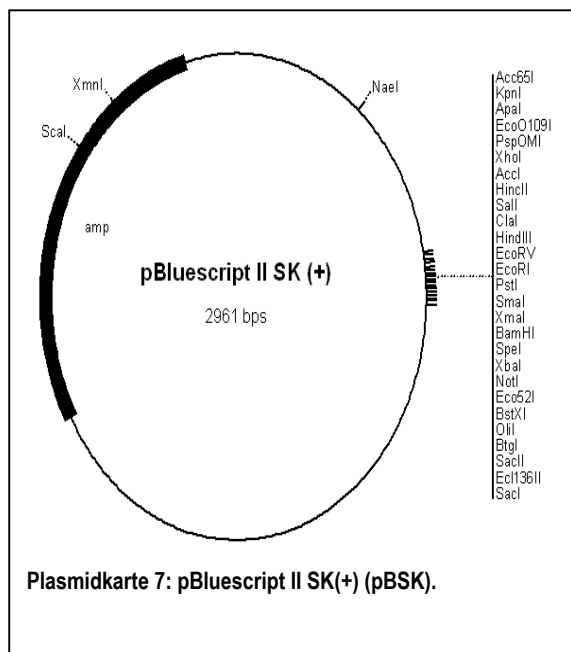
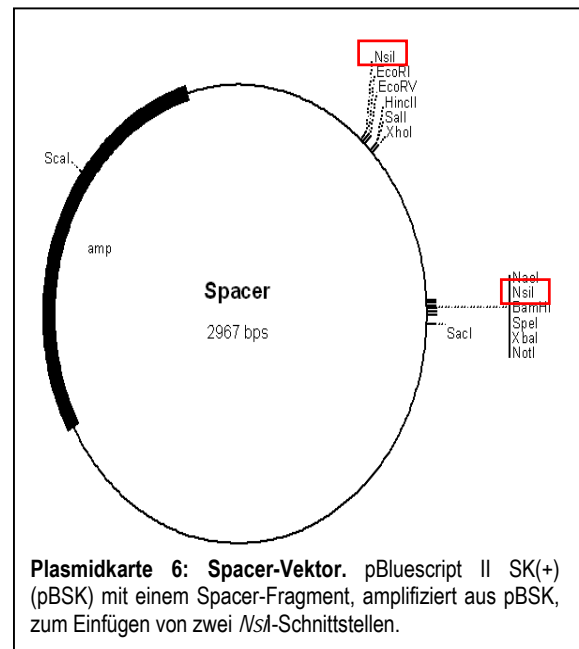
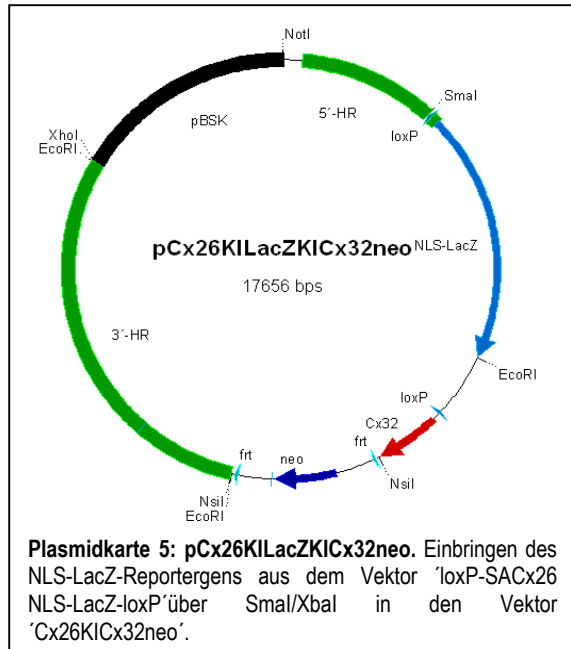
- VITALE, M.L.,** Cardin, J., Gilula, N.B., Carbajal, M.E., and Pelletier, R.-M. (2001) Dynamics of connexin 43 levels and distribution in the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary are associated with seasonal changes in anterior pituitary prolactin content. *Biology of Reproduction* 64: 625-633
- VON MALTZAHN, J.,** Euwens, C., Willecke, K., and Söhl, G. (2004) The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* 117: 5381-5392
- WANG, Y.F.,** and DANIEL, E.E. (2001). Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 281: G533-G543
- WHEATER, P.R.,** Burkitt, H.G., und Daniels, V.G. (1987) *Funktionelle Histologie; Lehrbuch und Atlas.* Urban & Schwarzenberg, München
- WHITE, T.W.,** and BRUZZONE, R. (1996) Multiple connexin proteins in single intercellular channels: Connexin compatibility and functional consequences. *J Bioenerg Biomembrane* 28: 339-350
- WHITE, T.W.,** and PAUL, D.L (1999) Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin function. *Annual Review of Physiology* 61: 283-310
- WHITE, T.W.,** Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (1994) Selective interaction among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility. *J. Cell Biol.* 125: 879–892
- WHITE, T.W.,** Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (1998) Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *Journal of Cell Biology* 143: 815-825
- WHITE, T.W.,** Paul, D.L., Goodenough, D.A., and Bruzzone, R. (1995) Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell.* 6: 459-470
- WHITE, T.W.,** Sellitto, C., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (2001). Prenatal lens development in connexin43 and connexin50 double knockout mice. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42: 2916-2923
- WILLECKE K.,** Eiberger J., Degen J., Eckardt D., Romualdi A., Güldenagel M., Deutsch U., und Söhl G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383: 725-737
- WILLECKE, K.,** and HAUBRICH, S. (1996) Connexin expression systems: To what extent do they reflect the situation in the animal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 4: 319–325
- WÖRSDORFER, P. (2005)** Untersuchung der Connexinexpression und Funktion an embryonalen HM1-Stammzellen der Maus. Diplomarbeit, Universität Bonn
- WRIGHT, C.S.,** Becker, D.L., Lin, J.S., Warner, A.E., and Hardy, K. (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction* 121: 77-88
- WU, J.C.,** Tsai, R.Y., and Chung, T.H. (2003) Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J. Cell Biochem.* 88: 823–835
- XU, X.,** Lin, W.E., Huang, G.Y., Meyer, R., Chen, T., Luo, Y., Thomas, M.P., Radice, G.L., and Lo, C.W. (2001) Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J. Cell Biol.* 154: 217–230
- YA, J.,** Erdtsieck-Ernste, E.B., de Boer, P.A., van Kempen, M.J., Jongsma, H., Gros, D., Moorman, A.F., and Lamers, W.H. (1998) Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ. Res.* 82: 360-366
- YAMAMOTO, T.,** Hossain, M.Z., Hertzberg, E.L., Uemura, H., Murphy, L.J., and Nagy, J.I. (1993) Connexin43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry* 100: 53-64

- YAMAMOTO, T.,** Hossain, M.Z., Hertzberg, E.L., Uemura, H., Murphy, L.J., and Nagy, J.I. (1975) Connexin 43 in rat pituitary gland. An in vivo and in vitro study. *J. Cell Biol.* 67: 469-476
- YAMANAKA, I.,** Kuraoka, A., Inai, T., Ishibashi, T., and Shibata, Y. (1997) Changes in the phosphorylation states of connexin43 in myoepithelial cells of lactating rat mammary glands. *European Journal of Cell Biology* 72: 166-173
- YAMASAKI, H.,** Krutovskikh, V., Mesnil, M., Tanaka, T., Zaidan-Dagli, M.L., and Omori, Y. (1999) Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C. R. Acad. Sci. III* 322: 151-159
- YANCEY, S.B.,** Easter, E., and Revel, J.P. (1979) Cytological changes in gap junctions during liver regeneration, *J. Ultrastruct. Res.* 67: 229-242
- YANCEY, S.B.,** Nicholson, B.J., and Revel, J.P. (1981) The dynamic state of liver gap junctions, *J. Supramol. Struct. Biochem.* 16: 221-232
- YEAGER, M.,** and GILULA, N. B. (1992) Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J. Mol. Biol.* 223: 929-948,
- YEAGER, M.,** und NICHOLSON, B.J. (1996) Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6: 183-192
- YEE, A.G.,** and Revel, J.P. (1978) Loss and reappearance of gap junctions in regenerating liver, *J. Cell Biol.* 78: 554-564
- YOUNG, L.J.,** Winslow, J.T., Wang, Z., Gingrich, B., Guo, Q., Matzuk, M.M. and Insel, T.R. (1997) Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behaviour and affiliation. *Horm. Behav.* 31: 221-231
- ZANIBONI, M.,** Rossini, A., Swietach, P., Banger, N., Spitzer, K.W., and Vaughan, R.D. (2003) Proton permeation through myocardial gap junction. *Circ. Res.* 93: 726-735
- ZEIGER, K. (1952)** Zur funktionellen Anatomie der Leber, *Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkr. Sonderbd.* 22-31
- ZHANG, J.T.,** and Nicholson, B.J. (1989) Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* 109: 3391-3401
- ZHENG-FISCHHÖFER, Q.,** Ghanem, A., Kim, J.-S., Kibschull, M., Schwarz, G., Schwab, J.O., Nagy, J., Winterhager, E., Tiemann, K., and Willecke, K. (2005) Connexin31 cannot functionally replace Connexin43 during cardiac morphogenesis in mice. Zur Publikation eingereicht.
- ZIMMER, D.B.,** Green, C.R., Evans, W.H. and Gilula, N.B. (1987) Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures, *J. Biol. Chem.* 262: 7751-7763
- ZOIDL, G.,** and DERMETZEL, R., (2002) On the search for electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res.* 310: 137-142

ANHANG

Vektorkarten





Einzelkanalleitfähigkeiten

Connexin	γ_i [pS]	V_0 [mV]	Referenz
Cx23	n.b.	n.b.	
Cx26 ¹	140	± 85	BUKAUSKAS et al., 1995
Cx29 ³	0	----	ALTEVOGT et al., 2002
Cx30 ¹	179	± 27	VALIUNAS et al., 1999
Cx30.2 ¹	10	n.b.	NIELSEN et al., 2003; KREUZBERG et al., 2005
Cx30.3 ¹	n.b.	± 72	HENNEMANN et al., 1992
Cx31	n.b.	n.b.	
Cx31.1 ¹	0	----	HENNEMANN et al., 1992
Cx32 ¹	55	± 55	BUKAUSKAS et al., 1995
Cx33 ²	0	----	CHANG et al., 1996
Cx36 ¹	15	± 72	TEUBNER et al., 2000
Cx37 ¹	315	± 28	TRAUB et al., 1995
Cx39	n.b.	n.b.	
Cx40 ¹	198	± 45	BUKAUSKAS et al., 1995
Cx43 ¹	100	± 66	VALIUNAS et al., 2000
Cx45 ²	30	± 13.4	BARRIO et al., 1987
Cx46 ¹	152	± 42	SAKAI et al., 2003
Cx47 ¹	55	± 51	TEUBNER et al., 2001
Cx50 ²	220	± 18	WHITE et al., 1995
Cx57 ¹ ; *	27	± 25	MANTHEY et al., 1999; HOMBACH et al., 2004

Einzelkanalleitfähigkeit (γ_i) und **Spannungsabhängigkeit** (V_0 = interzelluläre Spannungsdifferenz, bei der die Hälfte aller Kanäle inaktiv ist) der bislang bekannten Connexin Kanäle, gemessen in ¹HeLa-Zellen, ²Xenopus Oozyten oder ³N2A-Zellen. Die aus Cx29, Cx31.1, Cx33 und Cx39 aufgebauten Kanäle zeigten keinen interzellulären Stromfluss in den jeweiligen Fremdexpressionssystemen. * Der in Horizontalzellen der Retina ausgeprägte Cx57 Gap Junction Kanal ist sowohl in HeLa-Transfektanten als auch in Xenopus-Oozyten noch nicht elektrophysiologisch vermessen worden (cf. HOMBACH et al., 2004) n.b. = nicht bestimmt.

Blastozysteninjektionen

Datum der BCI	Eingesetzter ES-Zell-Klon (Passage)	Anzahl injizierter Blastozysten	Anzahl durchgeführter OP's, sowie Anzahl transferierter Blastozysten	Anzahl geborener Jungtiere	Anzahl chimärer Mäuse (Chimärismusgrad)
23.03.2004	140 (P 32)	20	1 10/10	----	----
24.03.2004	140 (P 32)	16 *	1 8/8	1/1	Gestorben als Jungtier
25.03.2004	140 (P 32)	60	a) 10/10 3 b) 10/10 c) 10/10	a) 1/1 b) 3/0 c) 2/2	a) Gestorben als Jungtier b) f 1 (80 %); f 2 (85 %) c) Gestorben als Jungtiere
30.03.2004	140 (P 34)	18	1 9/9	----	----
01.04.2004	140 (P 35)	36	2 a) 9/9 b) 9/9	a) 3/3 b) 1/1	a) Gestorben als Jungtiere b) Gestorben als Jungtier
06.04.2004	140 (P 37)	21	----	----	----
07.04.2004	140 (P 37)	32	1 16/16	----	----
08.04.2004	140 (P 37)	18	1 9/9	6/0	m 3 (40 %); m 4 (90-100 %) und m 5 (40 %)
04.05.2004	140 (P 35)	44	a) 8/8 3 b) 7/7 c) 7/7	a) 1/1 b) ---- c) ----	a) Gestorben als Jungtier b) ---- c) ----
05.05.2004	140 (P 35)	56	a) 10/10 3 b) 9/9 c) 9/9	a) ---- b) 1/1 c) 3/1	a) ---- b) ---- c) nur schwarze Tiere
06.05.2004	140 (P 35)	29	2 a) 8/7 b) 7/7	a) ---- b) 3/3	a) ---- b) Gestorben als Jungtiere
11.05.2004	140 (P 37)	34	2 a) 9/8 b) 0/8	a) 2/2 b) 3/2	a) Gestorben als Jungtiere b) m 6 (90-100 %)
12.05.2004	140 (P 38)	32	2 a) 8/8 b) 8/8	a) ---- b) 4/4	a) ---- b) Gestorben als Jungtiere
13.05.2004	140 (P 38)	----	----	----	----

Übersicht über die durchgeführten Blastozysteninjektionen und die daraus resultierenden Mäusen. Die Spalte, in der die Anzahl der jeweils transferierten Blastozysten angegeben ist, wurde zwischen linkem/rechten Uterus unterschieden. Bei der Anzahl der geborenen Jungtiere wurde links die Gesamtzahl der geborenen Mäuse und rechts die Anzahl der toten Tiere aufgeführt. In der letzten Spalte wurde die Anzahl der chimären Mäusen mit ihrem geschätzten Chimärismusgrad angegeben. * Hier wurden die Morulae vom Vortag verwendet, da keine Blastozysten präpariert werden konnten. f = weiblich, m = männlich Die Zahl hinter dem f bzw. m ist die Nummerierung der chimären Tiere, da hier keine Ohrmarken vergeben wurden.